

Année 1969-1970

Série E N° 208

THÈSE

présentée

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

par

Jean Gérard GOBERT

Contribution à l'étude de l'endoparasitisme
expérimental de *Trichomonas vaginalis*
chez la Souris.

Soutenue le : 1970

JURY: MM. les Professeurs R. CAVIER Président
M. PIETTE
J. SAVEL
P. GEORGES



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550203_0003

Année 1969-1970

Série E N° 20

THÈSE

présentée

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Etat)

par

Jean Gérard GOBERT

Contribution à l'étude de l'endoparasitisme
expérimental de *Trichomonas vaginalis*
chez la Souris.

Soutenue le :

JURY: MM. les Professeurs R. CAVIER Président
M. PIETTE
J. SAVEL
P. GEORGES

THÈSE

présentée

à la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris

pour l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'État)

par

Jean-Gérard GOBERT



Contribution à l'étude de l'endoparasitisme

expérimental de *Trichostrongylus axei*

chez la souris.

Soutenue le

JURY MM les Docteurs R. CAVIER
M. PETTE
J. BAYEL
P. GEORGES
Président

A Monsieur le Professeur R. CAVIER,
Chevalier de la Légion d'Honneur
Pharmacien-chef des Hôpitaux de Paris

qui nous a accueilli dans son
Laboratoire pour participer à
l'oeuvre commune, nous a encouragé
tout au long de ce travail et nous
a fait l'honneur de présider ce jury.

En témoignage de notre profonde
gratitude.

A Monsieur le Professeur M. PIETTE,
Chevalier de la Légion d'Honneur
Pharmacien-chef des Hôpitaux de Paris

qui nous a fait profiter de sa
compétence de cytologiste et
qui nous a fait l'honneur
d'accepter de juger ce travail.

En témoignage de notre déférente
gratitude.

A Monsieur le Professeur J. SAVEL,
Chef de Laboratoire des Hôpitaux de Paris

qui, depuis notre internat, nous
a conseillé, guidé, et manifesté
une inlassable bienveillance.

En témoignage de notre respectueux
attachement.

A Monsieur le Professeur P. GEORGES,

en souvenir des heures passées
ensemble à la paillasse et en
remerciement de l'aide et des
conseils qu'il nous a toujours
donnés.

Avec ma très amicale reconnaissance.

A ma femme, dont l'aide et l'affection
sont pour beaucoup dans l'aboutissement
de ce travail.

A mes parents,

A tous mes amis.

PERSONNEL

DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

M. MALANGEAU P.		DOYEN
M. GUILLOT M.	O + ...	Assesseur
M. DELAVEAU P.		Assesseur
M. RODINEAU L.	+	Secrétaire Général
Mme FERRARI S.		Attaché Principal d'Administration Universitaire Adjointe au Secrétaire Général
M. BRENN A.	+	Attaché Principal d'Intendance Universitaire
M. TRICAN J.N.		Attaché Principal d'Administration Universitaire
M. JEANDEL L.		Attaché d'Administration Universitaire
Mme ESPINASSE M.L.		Attaché d'Administration Universitaire
M. JACOB	+	Attaché d'Administration Universitaire
Mme MUR A.M.		Attaché d'Administration Universitaire
Melle FRIZOL E.		Attaché d'Administration Universitaire

DOYEN HONORAIRE

M. VALETTE Guillaume O +

PROFESSEURS HONORAIRES

M. LAUNOY L. O +
M. FLEURY P. O +
M. PICON M. O +

PROFESSEURS

M. JANOT M.M.	O +	Membre de l'Institut ...	Pharmacie Galénique (T)
M. VALETTE G.	O +		Pharmacodynamie (T)
M. PARIS R.	O +		Matière Médicale (T)
M. GUILLOT M.	O +		Physique (T)
M. GAUTIER J.A.	O +		Chimie Organique (T)
Melle LAMBIN S.	+		Microbiologie (T)
M. RAOUL Y.	+		Physiologie (T)
M. COURTOIS J.	+		Chimie Biologique (T)
M. DOMANGE L.	O +		Chimie Générale et Minérale (T)
M. TRUHAUT R.	O +	Membre de l'Institut ...	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
M. MORETTE A.	+		Hydrologie (T)
M. CAVIER R.	+		Parasitologie (T)
M. QUEVAUVILLER A.	+		Hygiène et Education Sanitaire (T)
M. MOREAU R.	+		Pharmacie Chimique (T)
M. GERMAN A.			Microbiologie
M. PIETTE M.	+		Hématologie (T)
M. MALANGEAU P.			Chimie Analytique (T)
M. GIRARD M.	+		Biochimie Appliquée (T)
M. DILLEMANN G.			Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M. DEYSSON G.	+		Botanique (T)
M. FLAHAUT J.			Minéralogie (T)
M. RENAULT J.			Chimie Organique (T)
M. LE HIR A.			Pharmacie Galénique (T)
M. BOUDENE C.			Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
M. LARUELLE P.			Physique (T)
M. ROSSIGNOL P.			Pharmacodynamie (T)
M. MANGEOT A.			Pharmacie Galénique Industrielle (T)
M. DELAVEAU P.			Séméiologie et Pathologie Générale (T)
M. COHEN Y.			Pharmacodynamie (T)
M. RENAULT H.			Physique
M. BOURDON R.			Chimie Analytique
M. REYNAUD P.			Pharmacie Chimique
M. LE MOAN R.			Toxicologie
M. POISSON J.			Pharmacie Galénique
M. MICHEL R.			Endocrinologie (T)
M. LECLERC M.			Hématologie
M. PERCHERON F.			Chimie Biologique
M. SAVEL J.			Biologie Animale
M. DESVIGNES A.			Cryptogamie et Technique Bactériologique
M. MIOCQUE M.			Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES

M. PAOLETTI C.		Toxicologie
M. BORY J.		Microbiologie
M. GUIGNARD J.L.		Botanique Générale
M. GOUNELLE J.C.		Physiologie
M. BINET P.		Biologie Animale
M. COMBET FARNOUX C.		Chimie Organique
M. PLAT M.		Chimie Analytique
Mme PLAT M.		Législation et Déontologie Pharmaceutique
M. DELACOUX E.		Pharmacie Chimique
M. CAVE A.		Matière Médicale
M. PUISIEUX F.		Pharmacie Galénique
M. DUCHON D'ENGENIERES M.		Chimie Organique
M. ADOLPHE C.		Physique
M. GUERNET M.		Chimie Analytique
M. DIDRY J.		Mathématiques appliquées aux Sciences Expérimentales
M. KHODADAD P.		Chimie Minérale
M. PERLES R.		Chimie Biologique
M. LEMONNIER A.		Biochimie Appliquée
M. YONGER J.		Chimie Analytique
M. HAMON M.		Chimie Analytique
M. MESTRE J.		Botanique
M. AGNERAY J.		Biologie
M. DREUX C.		Biochimie Appliquée
M. RIVET J.		Chimie Générale et Minérale
M. ETIENNE J.		Mathématiques
M. HAZEBROUCQ G.		Physique
M. ROUSSELET F.		Chimie Analytique
M. BOURRINET P.		Hygiène
M. SOULEAU Ch.		Chimie Générale et Minérale
Mme HUBERT J. (délég.)		Microbiologie
Melle BOURNIQUE C. (délég.)		Botanique

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M. GESTEAU P.	+
M. GUERIN H.	+
Mme HARISPE M.	
Melle LONGUEVALLE S.	
M. HARISPE	+

CHEFS DE TRAVAUX

M. ANDRE Guy	dél.	TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A
M. ADAM Yves	tit.	TP Pharmacie Chimique 5è A (Synthèse médicaments)
M. AYMARD Pierre	tit.	ED Physiologie - Histologie
Melle BARNIER Suzanne	dél.	Mathématiques
Melle BENOIS Martine	dél.	TP Botanique 2è A
Melle BERNARD Jacqueline	tit. ...	TP Bactériologie 5è A - Industrie
M. BESANCON Pierre	stag.	Mathématiques
Mme BLANC Jeanine	tit.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Mme BONALY Jacqueline	dél.	ED Botanique 1 A
Mme BOSIO A. Marie	dél.	TP Chimie Qualitative
M. BOURLIOUX Pierre	dél.	CES Bactériologie
M. BOY Pierre	dél.	Mathématiques
M. CAILLARD Claude	dél.	TP Pharmacodynamie 4 - 5 A
M. CANAL Jacques	dél.	ED et TP Biochimie Appliquée 5 A
M. CARRE Daniel	dél.	Mathématiques
Melle CARRERE Clotilde	tit.	TP Microbiologie 4 A
M. CEOLIN René	dél.	ED Chimie Minérale 1 A
Mme CENAC Jacqueline	tit.	CES Parasitologie
Mme CHARDENOT Paulette	tit.	Chimie Biologique 3 - 4 A
Mme CHARPENTIER Madeleine	tit. ..	ED Chimie Générale et Minérale 1 A
M. CHERON Jean-Marie	dél.	TP Chimie Biologique 3 - 4 A
Melle CLAIR Geneviève	tit.	ED Matière Médicale 3 - 5 A
M. DAGRON Christian	tit.	ED Chimie Générale et Minérale 2 A
M. DAVY Jean	dél.	CES Biochimie
Melle DECAUDIN M. Thérèse	tit. ..	TP Parasitologie 4 A
M. DELATTRE Jacques	dél.	DEPS Exploitation Biochimique
M. DELCOURT Alain	dél.	ED Botanique 2 A
M. DOUSSIN Alexandre	tit.	TP Chimie Analytique 5 A
Melle DUCHENE Dominique	dél.	CES Pharmacie Galénique Industrielle
Melle DUMANT Geneviève	tit.	CES Analyse physico-chimique des médicaments
Mme DUPONT Charlotte	tit.	CES Pharmacodynamie
M. ETIENNE Guy	tit.	TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A
Mme FAURE Liliane	stag.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Melle FLEURY Solange	tit.	ED Chimie Analytique Quantitative
Melle FOGLIETTI M. José	tit.	TP Chimie Biologique 3 - 4 A
M. GAIRARD Alexis	dél.	CES Contrôle médicaments (Biologie)
M. GAYRAL Philippe	dél.	TP Zoologie 1 A
Melle GERMAN Françoise	dél.	Mathématiques
M. GIRARDEAU J. François	dél. ...	TP Chimie Organique 5 A (Synthèse Organique)
M. GOBERT Jean	stag.	TP Zoologie 1 A
Melle GOURSAT M. José	tit.	ED Botanique 1 A
M. GROSSIORD J. Louis	dél.	TP Physique 1 A
Melle GUILLOUX Edith	dél.	TP Chimie Biologique 3 - 4 A
M. HENRY Jacques	tit.	Essais médicaments chimiques et galéniques

Mme JULIEN Maud	tit.	ED Physique 2 A
M. JULIEN René	tit.	ED Chimie Minérale 1 A
Melle JUND Yvonne	tit.	CES Microbiologie et contrôle médicaments Microbiologie
M. LALEGERIE Pierre	stag.	CES Biochimie
M. LAROCHE Jacques	tit.	TP 5 A - Secourisme - Hygiène - Education Sanitaire
Mme LEDUC Yvette	tit.	TP Chimie Analytique Qualitative
M. LEGENDRE Lucien	dél.	TP Chimie Organique 2 A
Mme LEGER Nicole	tit.	Parasitologie 5 A
M. LELUC Robert	tit.	CES Bactériologie
M. LEMAY René	tit.	CES Législation
M. LEPAREUR Christian	dél.	Mathématiques
Mme LE QUANG THUAN	stag.	TP Chimie Analytique Qualitative
M. LEVILLAIN Pierre	tit.	ED Chimie Analytique Qualitative
Mme LEVY Françoise	dél.	ED Botanique 2 A
M. LIKFORMAN Joseph	tit.	ED Physique 1 A
Melle LONGEVIALLE Monique	tit. ..	ED Botanique 1 A
M. MAHUZIER Georges	tit.	TP Chimie Analytique Quantitative
M. MANDEREAU Jean	tit.	CES Pharmacotechnie Chimique
M. MANET Léon	stag.	CES Biochimie
M. MARTIN-FRERE Henri	tit.	TP Chimie Générale et Minérale 1 A
M. MAUGUEN Yves	dél.	Mathématiques
Mme MAYRARGUE Joëlle	dél.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Melle MICHELET Annick	tit.	ED Chimie Générale et Minérale 2 A
M. MOULIN Pierre	dél.	TP Physique 1 A
Mme MOURY Jacqueline	stag.	TP Zoologie 1 A
Mme NOTTEGHEM M. Jacqueline	tit.	ED Parasitologie 4 A
M. NGUYEN Phu Lich	dél.	CES Toxicologie
Mme PANOUSE Jacqueline	tit.	CES Microbiologie - Virologie - Immunologie
Mme PAOLAGGI Françoise	stag.	CES Electrochimie (Biochimie Appliquée)
M. PESTIS Jean	tit.	TP Anatomie, Physiologie Humaine
Mme PIETTE Colette	tit.	CES Hématologie 5 A - Biologie
M. POUILLAIN Pierre	tit.	CES Hématologie 5 A - Biologie
M. POUSSET J. Louis	tit.	TP Chimie Extractive 5 A
M. QUENEZ Pierre	tit.	TP Chimie Générale et Minérale 1 A
Mme RABIAN Odile	dél.	ED Chimie Analytique Qualitative
M. RABARON Alain	dél.	CES Pharmacotechnie Galénique
Mme ROBERT Monique	tit.	CES Immunologie - Microbiologie
M. RODIER Noël	dél.	ED Physique 2 A
Melle ROLLEN Alice	tit.	TP Botanique 1 A
Melle ROUSSELET Renée	tit.	Essais médicaments végétaux
Mme RUDLER Michèle	dél.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
Mme SALES Nicole	stag.	TP Physiologie, Histologie
Melle SEBASTIEN Francine	dél. ...	TP Microbiologie 5 A (Biologie Officine)
M. SCHUSTER Jean	tit.	Essais des médicaments chimiques et galéniques
Melle SORIA Claudine	stag.	Biologie Officine 5 A
Mme SEILLER Monique	tit.	TP Pharmacie Galénique Industrielle

Melle STRUPLER Nicole	tit.	ED Chimie Générale et Minérale 1 A
M. TOUBOUL J. Pierre	dél.	TP Chimie Analytique 5è A
M. TRIEU Thuong Cong	tit.	TP Chimie Analytique Quantitative
Melle TROUPEL Solange	stag.	TP Chimie Analytique Quantitative
Mme VAN AMERONGEN Geneviève	dél.	ED Chimie Analytique Quantitative
M. VAYSSIÈRE J. Michel	dél.	ED Chimie Organique 1 - 2 A
M. VILLERS Jacques	tit.	TP Physique 2 A
Mme WELBY Josette	dél.	TP Pharmacie Galénique

BIBLIOTHEQUE

Melle RUYSEN Y.	+	Conservateur en Chef
Mme DESGRIPPES A.		Conservateur
Mme COULET M.A.		Conservateur
Melle LANGLOIS C.		Conservateur
N...'		Conservateur

Légion d'honneur	(+ Chevalier
	) O Officier
	(C Commandeur

ABREVIATIONS

An. inf.	Animaux infestés
D.I.	Dose infestante
H.E.P.	Hématies d'embryon de Poulet
I.M.I.	Indice moyen d'infestation
O.C.T.	Ornithine carbamyl transférase
P.P.I.	Pouvoir pathogène intrinsèque
P.P.I.M.	Pouvoir pathogène intrinsèque minimum
P.P.S.	Pouvoir pathogène supplémentaire
S.N.	Souris neuve
S.T.	Souris traitée
T.V.	Trichomonas vaginalis

AVANT-PROPOS

Les différentes espèces du genre Trichomonas s'observent dans les tractus digestifs et génitaux des Vertébrés où ils mènent une vie parasitaire, plus ou moins préjudiciable à l'hôte.

Ce parasitisme endocavitaire est remarquable par sa double spécificité concernant l'hôte d'une part et le biotope d'autre part, comme on peut s'en rendre compte en lisant, dans le tableau I, la liste des principales espèces inféodées aux Mammifères et aux Oiseaux et leur localisation chez ces animaux.

Le caractère sténoxène du parasitisme de Trichomonas vaginalis et l'originalité de son biotope chez l'hôte habituel ont suscité de nombreuses recherches fondées sur des infestations expérimentales.

Comme nous le verrons plus loin, celles-ci ont le plus souvent consisté en des tentatives d'implantation dans la cavité vaginale d'animaux femelles afin d'étudier les conditions de séjour et de développement du parasite dans les voies génitales ainsi que les modifications qu'il est capable d'y produire et, également, afin d'éprouver les médicaments destinés à le combattre.

Tableau 1

Espèces	Hôte	Localisation	Pouvoir Pathogène
<u>Trichomonas vaginalis</u>	Femme. Homme.	Voies génitales Vagin. Urètre.	+
<u>Trichomonas hominis</u> (Syn. <u>T. intestinalis</u>)	Homme. Femme.	Gros intestin	+
<u>Trichomonas tenax</u> (Syn. <u>T. buccalis</u>)	Homme. Femme.	Cavité buccale	-
<u>Trichomonas foetus</u> (Syn. <u>T. suis</u>)	Bovins. Porcs.	Voies génitales	+
<u>Trichomonas gallinae</u> (Syn. <u>T. columbae</u>)	Oiseaux colom- biformes.	Tube digestif	+

Cependant, quelques chercheurs ont réussi à sortir Trichomonas vaginalis de sa localisation habituelle et à le contraindre à un endoparasitisme au cours duquel il peut développer, vis à vis de divers organes de l'animal qu'il infeste, un tropisme et une agressivité assez inattendue chez un parasite qui paraissait strictement adapté à un biotope précis, biotope au niveau duquel il ne détermine, somme toute, que des désordres relativement mineurs.

Ces observations qui n'ont inspiré jusqu'ici qu'un nombre restreint de travaux nous ont paru poser d'intéressants problèmes concernant les nouveaux rapports que pouvait alors contracter un parasite avec un hôte, pour lui inhabituel, dans des conditions d'infestation et de localisation très différentes de celles qui lui sont familières.

Avant d'aborder l'exposé de notre travail, nos remerciements iront à tous ceux qui l'ont rendu possible. En particulier, que les Professeurs CAVIER et SABEL, nos maîtres en Parasitologie, le Professeur GEORGES qui nous a beaucoup appris sur Trichomonas, les Professeurs PIETTE et DIDRY qui ont mis à notre service leur compétence qui, de cytologiste, qui de mathématicien, veuillent bien trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre attachement.

INTRODUCTION

Le travail que nous présentons dans les pages qui suivent représente une contribution à l'étude de l'endoparasitisme expérimental de plusieurs souches de Trichomonas vaginalis, introduites par voie intrapéritonéale chez la Souris.

Plusieurs fois au cours de notre exposé, nous aurons à faire appel à certains aspects de la morphologie et de la biologie de Trichomonas vaginalis. Aussi, pour assurer une meilleure compréhension et une interprétation plus pertinente des faits nous semble-t-il opportun de faire un bref rappel zoologique et biologique.

I. Position systématique :

Trichomonas vaginalis fait partie de la super-classe des Flagellés (Tableau 2) qui est divisée en onze classes dont l'une d'entre elles rassemble les Zooflagellés (GRASSÉ (29)) qui possèdent un ou plusieurs flagelles et qui sont dépourvus de pigments assimilateurs ; la nutrition est phagotrophe ou osmotrophe. Les Zooflagellés sont eux-mêmes divisés en trois super-ordres. C'est donc dans le super-ordre des Métamonadines qu'est placé l'ordre des Trichomonadines.

Tableau 2

Embranchement des Protozoaires

Sous-embranchement des Rhizoflagellés -

Super-classe des Rhizopodes

- - - Flagellés

Classe des Phytomonadines

- - Xanthomonadines
- - Chloromonadines
- - Eugleniens
- - CRYPTOMONADINES
- - Dinoflagellés
- - Ebriediens
- - Silicoflagellés
- - Coccolithophoridés
- - Chrysomonadines

- - Zooflagellés.

Sous-embranchement des Actinopodes -

- - - Sporozoaires
- - - Pnidosporidies
- - - Ciliés.

Classe des Zooflagellés.

Super-ordre des Protomonadines -

- - - Métamonadines

Ordre des Trichomonadina.

Famille des Trimastigidae

- - Calonymphidae

- - Trichomonadidae.

Sous famille des Monocercomonadinae -

- - - Devescovinae -

- - - Macrotrichomonadinae -

- - - Trichomonadinae.

Genre Trichomonas -

espèce Trichomonas vaginalis.

Genre Pentatrichomonoides -

- Pseudotrypanosoma.

Ordre des Pyrsonymphina

- - Oxymonadina

- - Retortamonadina

- - Joeniidea

- - Lophomonadina

- - Trichonymphina

- - Spirotrichonymphina.

Ordre des Distomatina.

Super-ordre des Opalines.

GRASSE¹ (29) nous décrit cet ordre en ces termes :

"Constitué des Zooflagellés de taille petite, moyenne ou grande pourvue d'un axostyle, d'un jeu de 3 à 6 flagelles, dont l'un est récurrent, soit libre, soit adhérent au corps, soit rattaché à celui-ci par une membrane ondulante. Appareil parabasal toujours bien développé. Mitose à paradesmose qui, dans les grandes formes, appartient certainement au type pleuromitose. Nutrition phagotrophe ou osmotrophe. Libres, parasites ou symbiotiques"

Trois familles sont réunies dans l'ordre des Trichomonadines dont celle des Trichomonadinae.

GRASSE¹ (29) fait ainsi la diagnose de cette famille :

"Zooflagellés possédant 4 à 6 flagelles dont l'un se retourne toujours vers l'arrière, étant soit libre et traînant, soit adhérent au corps, en soulevant ou non une membrane ondulante. Un axostyle bien développé. Un appareil parabasal toujours présent et souvent puissant. Mitose du type trichomonadien ou pleuromitose avec paradesmose. Presque tous parasites ; se nourrissent soit de bactéries, soit de cellules empruntées à un hôte, soit de bois, soit de substances dissoutes"

Les Trichomonadinae (CHALMERS et PEKKOLA, 1917) en constituent l'une des quatre sous-familles dont GRASSE¹ (29) identifie les caractères comme suit :

"... présence d'une membrane ondulante que soulève le flagelle postérieur et que sous-tend une côte. Axostyle fibrillaire ou tubulaire. Tous parasites ; cette sous-famille se compose de 3 genres dont l'un, Trichomonas Donné, 1836, est répandu en tant que parasite cavitaire d'un nombre considérable de classes zoologiques"

C'est dans le sous-genre Trichomonas à 4 flagelles antérieurs que se trouve :

Trichomonas vaginalis Donné, 1836.

Le titre du mémoire où Donné (21) annonçait la découverte de ce protozoaire était ainsi rédigé :

"Infusoires. Animalcules observés dans les matières purulentes et le produit des sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme"

II. Morphologie

A. Observation en microscopie à contraste de phase

Observé à l'état vivant, au microscope à contraste de phase, Trichomonas vaginalis se présente comme un flagellé de 5 à 30 microns sur 3 à 15 microns, de forme variable, ronde, piriforme, semi-lunaire ou ovoïde.

Il possède :

- 5 flagelles, les quatre premiers, libres, sont en position antérieure ; ces flagelles sont inégaux, une paire étant plus longue que l'autre. Le cinquième flagelle, en position postérieure, adhère au corps cellulaire par une membrane ondulante et se termine avec elle. Cette membrane ondulante est plus courte que le corps, entre le tiers et la moitié. Elle est limitée :

- à l'extérieur, par le flagelle récurrent et un filament accessoire.

- à l'intérieur, par une côte soulignée par deux rangées de granules para-costaux bien visibles sur les préparations colorées par l'hématoxyline ferrique ainsi que chez les organismes vivants examinés en contraste de phase.

Dans la partie antérieure se trouve un granule basal complexe ou blépharoplaste qui coordonne les mouvements des deux paires de flagelles et de la membrane ondulante.

L'axostyle se présente comme une fine baguette qui prend naissance au niveau du blépharoplaste, longe ensuite le noyau, traverse tout le corps pour s'extérioriser enfin plus ou moins et se terminer en s'amincissant régulièrement (CAVIER, GEORGES et SAVEL (14)). Cet axostyle possède un capitulum spatulé sur un tiers de sa longueur totale et s'étend antérieurement en une pelta en forme de croissant qui est vue très clairement après coloration au protargol (HONIGBERG et KING (39)). Enfin, l'axostyle est souligné le long de son trajet par trois rangées de granules para-axostylaires formant un anneau chromatophile typique de Trichomonas vaginalis.

L'appareil parabasal constitue le corps de Golgi de la cellule. Il se présente sous forme d'un organite plus ou moins volumineux associé à un ou plusieurs filaments.

Le noyau est généralement ovale; il est situé dans la partie antérieure du corps cellulaire et contient souvent un petit nucléole arrondi. Ses dimensions sont, en moyenne, de 4,07 microns x 1,89 microns (HONIGBERG et KING (39)).

Il ne paraît pas exister de cytostome et les mêmes auteurs observent la plasticité remarquable du flagellé qui peut passer entre deux objets séparés par une distance presque égale au diamètre de leur axostyle. Assez fréquemment, particulièrement parmi les flagellés trouvés dans les sécrétions vaginales et dans les cultures récemment isolées, de

nombreux individus montrent des caractères nettement amiboïdes. D'ailleurs, dans toutes les souches, on peut observer la formation d'expansions comparables à des pseudopodes. Ces derniers peuvent être utilisés pour la capture des particules alimentaires ou pour la fixation. La locomotion est uniquement assurée par les battements flagellaires.

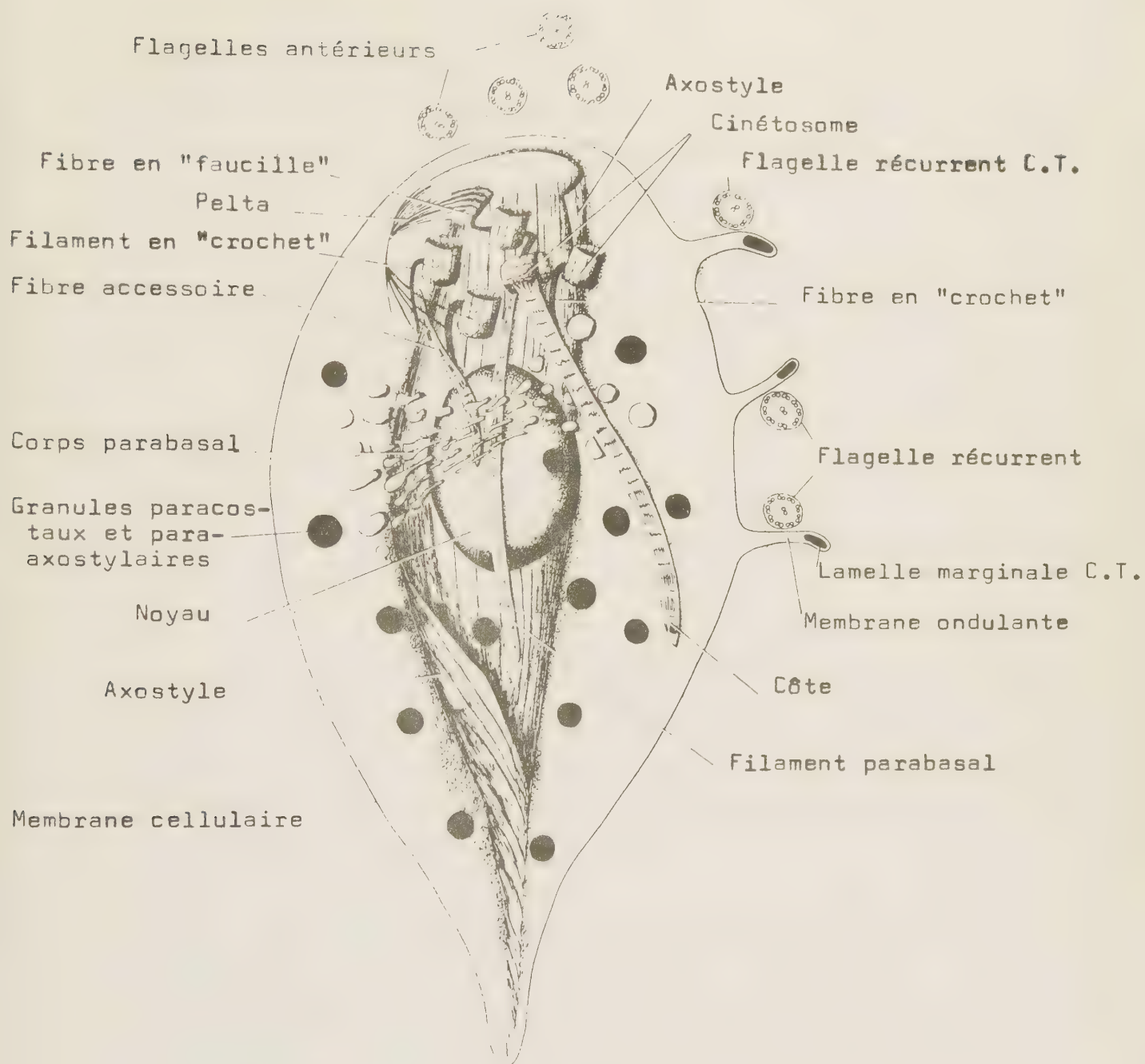
Des variations biométriques semblent liées au degré de virulence chez la femme ; les infestations aiguës semblent le plus souvent le fait des formes plus petites que celles qui s'observent dans les atteintes chroniques. Ces différences disparaissent lorsque les souches sont conservées en culture (KURNATOWSKA (57)).

B. Observation au microscope électronique.

L'étude de l'ultrastructure de Trichomonas vaginalis a été réalisée par plusieurs auteurs, dont INOKI (46), SMITH et STEWART (97), NIELSEN, LUDVICK et NIELSEN (78) dont nous reproduisons le diagramme en demi-perspective de Trichomonas vaginalis (figure 1).

Le noyau est circonscrit par une simple membrane de 7 milli-microns d'épaisseur et formée de trois couches. A l'intérieur du noyau, on observe fréquemment plusieurs granules sombres. Ces derniers représentent, soit les nucléoles, soit des mottes de matériel chromatinien.

Le corps parabasal présente l'ultrastructure habituelle du corps de Golgi. Il est localisé près du pôle nucléaire antérieur, à l'opposé de l'axostyle. C'est un empilement de cisternae aplaties, en plus ou moins grand nombre, et disposées à



Trichomonas vaginalis : diagramme en semi-perspective

fait à partir de microscopie électronique

(D'après NIELSEN et col. 1966).

peu près parallèlement à la surface nucléaire. Sur les marges peuvent être observées des vésicules qui semblent s'être isolées des cisternae par bourgeonnement et striction. Tous ces éléments sont limités par une membrane à triple couche.

Le blépharoplaste ou cinétosome est constitué par 4 granules basaux correspondant aux 4 flagelles antérieurs. Les granules sont disposés radialement autour d'un cinquième sur lequel est inséré le flagelle récurrent. A noter, en annexe au blépharoplaste, les deux fibres accessoires de la côte et le filament parabasal; la côte est plus longue et plus large que le filament parabasal, elle se trouve vers la périphérie près de la membrane ondulante alors que le filament parabasal est plus près du centre.

Le réticulum endoplasmique, de type lisse, est souvent disposé en couronne autour du noyau. Il est toujours abondant dans la région délimitée par le capitulum de l'axostyle. Des ribosomes libres sont répartis dans tout le cytoplasme, et souvent groupés en polysomes ; d'autres sont disposés en bordure du réticulum endoplasmique.

Des vésicules de différentes tailles et des microtubules limités par une membrane à trois couches sont fréquemment observés à la périphérie de la cellule. D'autres vésicules plus grandes et des vacuoles parfois opaques aux électrons sont situées dans la région caudale. La plupart d'entre elles sont sans doute des vacuoles alimentaires.

Les granules para-axostylaires, mesurant à peu près 0,5 microns, sont opaques aux électrons. Il y a aussi de petits granules sans membrane limitante constituées par une substance dense.

SMITH et STEWART (97) confirment l'observation qu' INOKI (46) avait faite selon laquelle Trichomonas vaginalis ne possèderait pas de mitochondries ; ce fait est en relation avec le métabolisme anaérobie du parasite. Nous verrons plus loin que cette affirmation doit, en fait, être plus nuancée.

L'axostyle, en forme de cuiller, apparaît composé d'une rangée de 35 fibrilles de 200 Å de diamètre. Sa gaine est faite d'une cinquantaine de fibres tubulaires parallèles.

III. Biologie

A. Reproduction

Trichomonas vaginalis se multiplie par bipartition et la division du noyau est de type pleuromitotique. Selon HAWES (31), le caryotype serait constitué de cinq chromosomes. Après la division nucléaire, l'appareil locomoteur se divise et la cytotodièrèse commence. HOFFMAN et MALYSZKO (35) décrivent des divisions multiples. Ils observent des Trichomonas polynucléaires, présents surtout chez les femmes après quelques jours de traitement. Ils trouvent aussi des formes polynucléaires dans les sécrétions urétrales. Il s'agit, sans doute, de la conséquence de conditions d'environnement peu favorables qui entraînent l'apparition de ces formes à multiples noyaux.

Comme chez les autres espèces du genre, il n'a jamais été possible d'observer de reproduction sexuée.

B. - Formes de résistance du Trichomonas

De nombreux protozoologistes ont depuis longtemps débattu la question de l'existence de formes kystiques chez Trichomonas vaginalis ; l'opinion prévaut actuellement que cette

forme kystique n'existe pas (SCHMIDT-HOENSDORF (89)). Pour LAPIERRE (60), la transmission de Trichomonas vaginalis se fait directement par contact sexuel et ces formes de résistance ne sont donc pas une nécessité, comme l'enseignent les données de la pathologie générale. Cependant, on a pu observer, dans les sécrétions vaginales ou urétrales aussi bien que dans des cultures déjà anciennes, des formes sphériques et immobiles qui peuvent présenter l'aspect général de kystes de protozoaires.

Ces formations, observées après coloration de MAY-GRUNWALD GIEMSA, présentent un cytoplasme nettement basophile et un noyau rouge violacé finement granuleux ; on n'y observe jamais de flagelles ni de membrane kystique. Elles doivent être considérées, pour certains, comme des formes dépérissantes destinées à mourir si elles ne sont pas transportées assez tôt dans un milieu de culture convenable ou accueillies dans les voies génitales d'un partenaire.

Pour d'autres, comme MICHALZICK (71), les flagellés, même en l'absence d'une membrane kystique morphologiquement identifiable, sont en état de survivre, dans des conditions de milieu défavorables, sous des formes permanentes qui ont la faculté de se diviser à nouveau quand les conditions extérieures redeviennent favorables. Enfin, BOCCI et DURANDO (11) mettent l'accent sur la capacité des formes de résistance à caractères morphologiques modifiés, de pouvoir résister à toute chimiothérapie.

C. Biochimie

Il est important d'insister sur le fait que les investigations biochimiques sur Trichomonas vaginalis n'ont été possibles qu'après la mise au point de méthodes capables de procurer des cultures dépourvues de tout germe associé.

Nous ne rapporterons pas ici les nombreux travaux consacrés à ce sujet. On pourra consulter à ce sujet les revues de SAVEL (87) et de JIROVEC-PETRU (52).

La composition chimique du Protozoaire pendant la phase logarithmique de sa multiplication est rapportée par MICHAELS (69) ; on y trouve : 60 p. 100 de protéines, 20 p. 100 d'acides ribonucléiques, 0,3 p. 100 d'acides désoxyribonucléiques, 18 à 20 p. 100 de glycogène, 1,65 p. 100 de lipides.

Le poids sec de 10^6 cellules est de 100 micro-grammes.

Sur le plan métabolique, Trichomonas vaginalis est généralement considéré comme un parasite anaérobie ; dépourvu de mitochondries et de cytochromes, il supporte mal une tension en oxygène importante et ce fait rend nécessaire la diminution du potentiel redox des milieux de culture, par addition de substances réductrices telles que le thioglycolate, la cystéine ou mieux l'acide ascorbique ; (HOLLANDER et FROST (36)). Cependant, dans certaines conditions, il est capable de consommer de l'oxygène et, en fait, il semble que ce soit plutôt un animal anaérobie facultatif.

Trichomonas vaginalis est capable de métaboliser de nombreux glucides, oses et osides.

Sa source essentielle d'énergie est certainement le glucose dont la présence stimule fortement la croissance en culture. C'est ainsi qu'ASAMI (2) estime que la quantité de glucose consommée par une culture qui passe de 9000 à 3×10^6 individus est de l'ordre de 4,5 mg. Selon le même auteur, il en va de même du fructose, du maltose, du glycogène, de la dextrine et, peut-être à un moindre degré, du sucrose et de l'amidon soluble. En revanche, le galactose et le lactose ne semblent pas utilisés.

On observe, concurremment à l'utilisation des glucides, la production d'acides organiques constitués par 40 p. 100 d'acide lactique (20 mg/100 ml pendant 96 heures d'incubation) près duquel on note également la présence d'acide malique.

Ce métabolisme glucidique fait intervenir :

- le schéma d'EMBDEN-MEYERHOF ; les enzymes glycolytiques ont été étudiés par BAERNSTEIN (4-5-6), WIRTSHAFTER (117) WELLERSON et KUPFERBERG (116), WIRTSCHAFTER et JAHN (118) LINDBLOM (61) KUPFERBERG (56).

Ces auteurs observent, dans des extraits cellulaires, le fonctionnement de l'aldolase, de la triose-phosphate-déshydrogénase, de la triose-phosphate-isomérase, de la phospho-fructokinase, de la lacticodéshydrogénase et du système pyruvate-kinase.

Trichomonas vaginalis est l'un des rares protozoaires capables de fixer l'anhydride carbonique que l'on retrouve intégralement dans l'acide lactique, comme l'ont prouvé les essais menés avec $^{14}\text{CO}_2$ par KUPFERBERG (56). Ce fait semble exclure l'incorporation de CO_2 par carboxylation pyruvique. De plus, WIRTSCHAFTER et JAHN (118) ont affirmé que le cycle tricarboxylique de KREBS n'est pas la voie d'oxydation du pyruvate bien qu'on ait identifié la présence des déshydrogénases succinique, malique et citrique. SCHARMA et BOURNE (95) mettent en évidence une faible activité cytochrome-oxydasique dans des granules qui joueraient ainsi le rôle de mitochondries. Plus tard, ils signalent la présence d'A.T.P. (93) qui intervient dans la libération d'énergie et dans les phénomènes de perméabilité au niveau de la membrane.

READ et ROTHMAN (83) analysent les gaz produits par les flagellés et montrent la présence de gaz carbonique, d'hydrogène et d'ammoniac. Ils ne trouvent pas de méthane.

La présence de riboflavine et de flavine mononucléotide a été montrée par KUPFERBERG (56) ; celui-ci cite aussi quelques souches qui produisent de l'hydrogène probablement lié au transport des électrons.

En ce qui concerne les interrelations métaboliques, il nous faut retenir les travaux de KUNITAKE, STILL et SALTMAN (55) qui, en utilisant le glucose marqué et le succinate marqué, démontrent l'incorporation des atomes de carbone radioactif dans 15 amino-acides, puis dans les protéines. Il semblerait donc que fonctionne un ensemble de réactions dont certaines existent dans le cycle de KREBS classique.

A noter, pour en terminer avec le métabolisme glucidique, que SCHARMA et BOURNE (94) ont pu mettre en évidence et localiser la glucose. 6.phosphatase, la glucose.1.phosphatase et la fructo.6.phosphatase, ce qui leur permet de penser que le cycle des pentoses d'HONECKER peut fonctionner chez Trichomonas vaginalis à côté de celui d'EMBDEN-MEYERHOF.

L'acide désoxyribonucléique (A.D.N.) de Trichomonas vaginalis a été étudié par MANDEL et HONIGBERG (67) . Il s'agit d'un A.D.N. du type adénine-thymine, qui semble différent de celui de la plupart des autres flagellés car on y observe une large dispersion dans la distribution de la composition moléculaire de l'A.D.N..

L'A.D.N. est le plus souvent limité à la chromatine et apparaît sous forme de bâtonnets, globules ou autres formations. (SHARMA, BOURNE (92)).

L'acide ribonucléique (A.R.N.), qui présente une grande activité métabolique, est localisé au niveau du nucléole, dans la membrane nucléaire et dans le cytoplasme autour du noyau.

Trichomonas vaginalis est capable de métaboliser bon nombre d'acides aminés mais peut aussi en réaliser la synthèse. Cependant, il ne possède que de faibles possibilités de transamination ; KOJIMA (53) a décelé la présence d'histamine dans la leucorrhée vaginale des malades parasitées alors qu'IYORI (47) n'a pu identifier l'histamine dans les milieux de culture ni provoquer la décarboxylation de l'histidine pour produire de l'histamine.

D. Sérologie et immunologie

Les recherches d'ordre sérologique et immunologique ne revêtent qu'un intérêt théorique puisque la parasitose est plus facile à diagnostiquer par la découverte du parasite sous le microscope ou après une mise en culture.

Plus intéressante peut être la recherche des anticorps chez l'homme contaminé dont les parasites sont souvent très difficiles à mettre en évidence et dont l'affection reste fréquemment asymptomatique.

Les auteurs ont proposé :

1° La réaction de fixation du complément (R.F.C.).

HOFFMAN, CORCZYNSKI, KARBOWSKI (34) utilisent la R.F.C. selon la technique quantitative de KOLMER. Ils trouvent une réaction positive chez 80 p. 100 des femmes parasitées et 40 p. 100 des hommes parasités.

Le taux d'anticorps est plus grand chez les malades chroniques que chez ceux qui présentent une infestation aiguë.

2° Les réactions d'agglutination. Leur mise en oeuvre se heurte aux difficultés que suscite la présence dans le sérum

humain normal d'agglutinines spontanées vis à vis de Trichomonas vaginalis, actives aux titres de 1 p. 40 à 1 p. 80. La même remarque peut être faite pour le sérum de Lapin (TERAS et NIGESSEN (103)). Chez les sujets malades, les titres en agglutinines vont de 1 p. 200 à 1 p. 480 et parfois davantage. Les réactions d'agglutination semblent présenter une spécificité inférieure à celle de la R.F.C..

3° L'Intradermo-réaction.

L'intradermo-réaction, qui fut longtemps considérée comme peu spécifique, a été quelque peu réhabilitée par JAACKMEES et TERAS (50) qui utilisent des antigènes corpusculaires (contenant des particules cellulaires) sélectionnés à partir de tous les sérotypes.

En effet, Trichomonas vaginalis ne constitue pas une espèce sérologiquement homogène. C'est ainsi que SCHOENHER (91), TERAS (101-102), NIGESSEN (79), JAACKMEES (49) ont pu décrire une dizaine de sérotypes distincts et TERAS estime que la qualité de telle ou telle réaction sérologique doit tenir compte de l'existence de ces sérotypes et préconise donc l'utilisation d'un antigène polyvalent pour estimer correctement la valeur des réactions sérologiques ou encore pour mener des recherches dans le domaine immunologique.

CHAPITRE I

Obtention d'infestations expérimentales par différentes espèces du genre Trichomonas

Travaux antérieurs

Les premiers travaux, publiés par BOS (13), concernent l'introduction de cultures, probablement abactériennes, de Trichomonas columbae, chez la Souris, par différentes voies ; intrapéritonéale, intramusculaire, sous-cutanée. L'auteur observe ainsi, chez les animaux infestés, l'apparition et le développement de manifestations chroniques avec lésions au niveau desquelles des flagellés sont retrouvés vivants au bout de quelques semaines.

Ces résultats furent ultérieurement confirmés par WAGNER et HEES (113) et par WAGNER (112), qui observent une péritonite à Trichomonas chez des souris infestées par voie intrapéritonéale. Cependant, ces auteurs ne précisent pas le caractère amicrobien des cultures utilisées.

Ultérieurement, d'autres infestations expérimentales furent pratiquées avec des espèces différentes.

WITTFOGEL (119) ainsi que MIESSNER et HANSEN (73) utilisent Trichomonas gallinae pour infester la Souris tandis que MORGAN (77), après les échecs de TRUSSEL et MAC NUT (106), réussit à implanter Trichomonas foetus chez la Souris et le Cobaye. Les résultats obtenus par ces derniers auteurs sont d'autant plus satisfaisants que les flagellés inoculés sont plus récemment prélevés dans les voies génitales de la Vache.

TRUSSEL (105), dans sa monographie de 1941, fait l'historique de toutes les tentatives pour implanter Trichomonas vaginalis chez l'animal et conclut que celui-ci n'a pas de prédilection pour les petits animaux. Les inoculations par voie intrapéritonéale, intrahépatique, et sous-cutanée ne permettent sa survivance que dans la mesure où les abcès dus à des bactéries associées peuvent se développer.

On peut dire que c'est à partir de 1950 que s'ouvre, avec les travaux de SCHNITZER, KELLY et LEIWANT (90), la période des expérimentations systématiques fondées sur l'inoculation, par différentes voies d'introduction, de diverses espèces de Trichomonas, cultivées dans des conditions aseptiques, chez des animaux de laboratoire variés.

I. Infestations expérimentales par voie vaginale.

Les premiers, SCHNITZER, KELLY et LEIWANT (90), puis UHLENHUTH et SCHOENHERR (107), inoculent dans le vagin du Hamster femelle, Mesocricetus auratus, une culture de Trichomonas vaginalis et réussissent ainsi, après la première inoculation, à infester 20 à 30 p. 100 des animaux et 80 à 90 p. 100 des animaux soumis à des infestations répétées. La transmission expérimentale d'un animal à l'autre est possible. Les auteurs estiment que

leurs résultats doivent être plus prudemment interprétés que ceux qu'ils ont obtenus avec Trichomonas foetus car ils admettent la possibilité d'une infestation concomitante par Trichomonas intestinalis.

En 1957, VERSCHINSKY (110) infeste le Hamster ; cette infestation se prolonge 15 jours à 1 mois mais l'auteur note la présence de petits animalcules de 6 à 7 microns, possédant 3 flagelles et un axostyle, donc très différents de Trichomonas vaginalis acclimaté chez le Hamster.

Notons, qu'en 1961, MICHAELS, STRUBE (70) utilisent aussi Trichomonas foetus dans le vagin du Hamster femelle pour l'essai de trichomonacides.

Cependant, les observations précédentes furent décidément confirmées par les infestations obtenues en 1957 par CAVIER et MOSSION (15-16).

Ces auteurs, en étudiant l'évolution du pH vaginal de la Ratte au cours du cycle oestral, notent qu'il varie de 6,6 à 9. Ils pensent qu'en établissant ce pH aux environs de 7, ils favoriseraient l'implantation du flagellé. Or, cette valeur est celle qui correspond à la période d'ovulation et ils imaginent donc de travailler sur des femelles castrées et maintenues en oestrus permanent par injection d'oestrogènes.

Inoculé dans le vagin de tels animaux, Trichomonas vaginalis s'installe et se multiplie dans ce nouveau biotope où il se maintient pendant 40 à 76 jours après l'arrêt de tout traitement hormonal. Les auteurs écrivent à ce propos : "adapter un parasite d'une espèce à une autre, c'est rompre sa spécificité ou, plus exactement, identifier le milieu du deuxième hôte à celui du

premier de telle façon que le parasite puisse vivre aussi bien chez l'un que chez l'autre."

Ces résultats sont confirmés par COMBESCOT, PESTRE, DOMENECH et VERAÏN (18) qui obtiennent une infestation vaginale chez les rattes non castrées mais maintenues en oestrus permanent par un implant sous-cutané de 20 mg d'oestradiol.

SOSZKA, KAZANOWSK et KUCZYNSKA (98), ainsi que GINEL (26), infestent des cobayes avec Trichomonas vaginalis. Les auteurs s'intéressent aux modifications biochimiques subies par la muqueuse vaginale sous l'influence du parasite. Ils observent ainsi l'augmentation de la teneur en A.R.N. des noyaux des cellules constituant la couche malpighienne de l'épithélium vaginal. Il est intéressant de noter que la même observation peut être faite au cours des états néoplasiques affectant cette muqueuse et on est ainsi amené à envisager l'étude des rapports qui peuvent unir la trichomonase vaginale et les états cancéreux, en particulier l'épithélioma in situ.

De son côté, GINEL (26), dans les mêmes conditions que précédemment, observe, vers le troisième jour, des symptômes très nets d'inflammation du tractus génital avec gonflement et rougissement de la vulve, présence d'une abondante leucorrhée jaunâtre et spumeuse exhalant une odeur forte et caractéristique.

A l'examen microscopique, l'auteur observe, à côté des flagellés, de grandes plages de leucocytes et de cellules épithéliales exfoliées, plus ou moins altérées, avec des noyaux hyperchromatiques. Il signale aussi la présence de nombreuses cellules macrophagiques mononucléées.

A l'examen histologique, les cellules de la muqueuse vaginale montrent les caractéristiques de l'inflammation, dilatation capillaire et infiltration leucocytaire.

En 1964, GEORGES (25), au cours d'une étude comparative du comportement biologique de quelques espèces du genre Trichomonas, observe qu'en ce qui concerne la possibilité d'une infestation vaginale par telle ou telle espèce, il faut tenir compte d'un certain nombre de facteurs. Il attire, en particulier, l'attention sur l'âge de la culture et sur certains facteurs liés à la nature même du Trichomonas, qui est peut-être capable de s'adapter à diverses conditions de vie. Ces observations sont à rapprocher de celles d'HONIGBERG (37), BOGOVSKY, TERAS (12) et REARDON, ASHBURN, JACOBS (84) dont les essais d'inoculation, par voie sous-cutanée pour le premier, par voie intrapéritonéale pour les autres, avaient mis en évidence des différences de comportement entre les diverses souches utilisées.

II. Infestations expérimentales par voie sous-cutanée.

De nombreux auteurs ont également utilisé la voie sous-cutanée en mettant en jeu des inoculum plus ou moins importants de flagellés. Au cours de leurs publications successives, SCHNITZER, KELLY et LEIWANT (90), HONIGBERG (37-41), JEFFRIES et HARRIS (51) codifient les conditions nécessaires à l'obtention d'abcès sous-cutanés.

D'autres, comme LYNCH, HOLLEY et MARGISON (64), BARR et BRENT (7), se servent aussi de cette voie d'infestation pour l'essai de trichomonaçides.

HONIGBERG (37), en particulier, propose la méthode suivante pour apprécier le pouvoir pathogène de différentes souches de Trichomonas vaginalis. Les flagellés sont obtenus par culture pure et injectés sous la peau à raison de $8 \text{ à } 9 \times 10^5$

individus sous un volume de 0,5 ml. Au bout de 6 jours d'évolution, la taille de l'abcès qui s'est développé sert de critère d'appréciation du pouvoir pathogène d'une souche donnée et de comparaison entre les diverses souches essayées.

Une comparaison statistique du volume de ces abcès sous-cutanés révèle que, pour les différentes souches, les virulences expérimentales observées chez l'animal se rangent dans le même ordre que celles dont elles ont fait preuve dans leur biotope normal. Cependant, leur pouvoir pathogène ne semble pas se maintenir chez les souches conservées en culture, celles-ci perdant peu à peu leur caractère agressif. Le même auteur, en privant Trichomonas vaginalis de la présence d'agar dans son milieu, diminue chez le flagellé, ce pouvoir pathogène. Il semble que le rôle exact de cet adjuvant puisse se situer aussi bien au niveau des tissus de l'hôte qui subissent, de sa part, une irritation qui les rend plus sensibles, qu'au niveau du parasite lui-même dont le contact avec l'agar semble modifier le comportement biologique. Il fait des observations analogues en utilisant la méthylcellulose et, à un degré moindre, la mucine ; en revanche, la gélatine se montre incapable de provoquer une telle exaltation de la virulence.

Ces travaux ont été repris en 1967 par JEFFRIES et HARRIS (51) dont les conclusions confirment celles d'HONIGBERG. Cependant, pour obtenir des abcès sous-cutanés, il leur faut injecter un nombre plus considérable de flagellés, de l'ordre de 2×10^6 . Ils retrouvent également l'action de l'agar.

FROST et HONIGBERG (23) décrivent les effets de l'installation de Trichomonas vaginalis après injection sous-cutanée. Il s'agit d'une inflammation aiguë dont le délai d'apparition, après l'introduction des flagellés, est variable selon les souches.

On observe l'afflux de leucocytes polynucléaires, la multiplication des protozoaires, la mort des polynucléaires, la destruction des tissus environnants.

La zone périabcédaire s'oedématie, subit la pénétration des flagellés et l'infiltration leucocytaire ; ces phénomènes se traduisent par la formation de couches alternées de leucocytes et de Trichomonas. Le processus s'étend ainsi de proche en proche pendant un certain temps. L'importance de l'extension et sa durée sont variables avec la souche et, selon les auteurs, sont liés à son pouvoir pathogène, comme le prouve la corrélation qui est trouvée entre le volume des abcès sous-cutanés et la sévérité des troubles vaginaux et cervicaux chez la femme parasitée.

Il semble aussi qu'il faille tenir compte, dans l'interprétation des résultats fournis par les infestations expérimentales, de la souche des souris utilisées. A cet égard, les travaux de KULDA (54), qui utilisent la méthode d'HONIGBERG (37), effectués sur 8 souches différentes de souris, montrent que le développement des abcès sous-cutanés est le plus important chez les animaux de la souche A. L'auteur déconseille l'utilisation des sources DBA et DBA₂, et recommande Balb/c comme standard.

III. Infestations expérimentales par voie intra-musculaire.

Elles ont surtout été étudiées par SCHNITZER, KELLY et LEIWANT (90) qui, après avoir confirmé les résultats de BOS (13) obtenus avec Trichomonas columbae, obtiennent des abcès souvent importants après inoculation intra-musculaire de Trichomonas foetus, Trichomonas gallinae et Trichomonas vaginalis. Après inoculation dans le muscle de la patte arrière, un abcès se développe progressivement, en 14 à 18 jours, et, à ce moment, occupe un volume de 500 à 2200 mm³. Il renferme un pus épais et verdâtre contenant de

très nombreux flagellés et des leucocytes. L'évolution ultérieure consiste en une résorption progressive de l'abcès en 8 à 12 semaines. Au cours de cette période, on peut encore observer la présence de protozoaires mobiles dans la lésion.

A noter enfin qu'il existe une relation directe entre le nombre de flagellés injectés et la durée de l'évolution : l'injection de $2,5 \times 10^6$ Trichomonas vaginalis par animal produit des abcès qui durent au moins 4 semaines, tandis que ceux produits par $2,5 \times 10^5$ flagellés ne durent pas plus de 2 semaines ; avec une inoculation de $2,5 \times 10^4$ flagellés, aucun abcès n'est obtenu.

IV. Infestations expérimentales de la chambre antérieure de l'oeil et du corps vitré.

WELD et KEAN (115) ont réussi, en 1956, l'installation de Trichomonas vaginalis dans la chambre antérieure et dans le corps vitré de l'oeil de Lapin. 22 sur 28 des yeux inoculés présentent des flagellés vivants avec une meilleure réussite pour le corps vitré.

D'autre part, d'après PARONIKJAN (81), aucune infestation ne peut être obtenue par voie intra-nasale, bucale ou intestinale.

V. Infestations expérimentales par voie intrapéritonéale.

Les premiers travaux menés de façon rigoureuse avec des protozoaires conservés en culture abactérienne sont ceux de SCHNITZER et collaborateurs (90) à partir de Trichomonas gallinae. La souche utilisée développe, chez la Souris, un pouvoir pathogène

élevé après une injection intrapéritonéale de 2×10^6 flagellés sous un volume de 0,5 ml.

Après un temps d'incubation d'une huitaine de jours au long desquels ne peuvent être observés ni lésions, ni parasites, apparaissent de nombreux et petits abcès, toujours localisés dans la cavité péritonéale dans lesquels vivent de nombreux parasites très mobiles. Après inoculation de Trichomonas vaginalis dans les mêmes conditions expérimentales, la démarche de l'infestation est à peu près comparable : il s'agit, dans les deux cas, d'un tableau de péritonite chronique que vient nuancer, pour Trichomonas gallinae, la présence d'abcès hépatiques qui, selon les auteurs, font toujours défaut avec Trichomonas vaginalis, même après inoculations répétées d'une population de l'ordre de 7×10^6 individus. Cela peut être dû au fait que la période d'observation ne fut pas étendue au-delà de 3 semaines.

HONIGBERG (37) dit à propos de ce travail : "Du fait "que les auteurs travaillèrent avec une seule souche de chaque "espèce (Trichomonas vaginalis, Trichomonas gallinae, Trichomonas "foetus), leurs conclusions ont été justifiées par référence à "ces souches particulières mais, comme l'indique notre étude, ne "reflètent pas nécessairement le pouvoir pathogène relatif de "toutes les espèces."

En 1952, INOKI et HAMADA (45) essaient divers traitements en vue de faciliter l'installation, chez la Souris, de Trichomonas vaginalis inoculé par voie intrapéritonéale.

Ils retiennent celui qui consiste à faire précéder l'inoculation des parasites d'une injection intra-veineuse d'érythrocytes de jeune poulet. Chez les souris ainsi traitées, on observe, après inoculation intrapéritonéale des flagellés, des infestations mortelles.

L'importance de ces observations pour la suite de nos travaux mérite que nous donnions ici quelques détails d'ordre expérimental.

- Les hématies de poulet sont obtenues par ponction cardiaque, le culot d'hématies est lavé à 3 reprises avec une solution saline isotonique et finalement remis en suspension de manière à obtenir une dilution de 10^7 hématies par ml.

- Chaque souris, dont le poids est de l'ordre de 10 g, reçoit 0,1 à 0,5 ml de cette suspension, par voie intraveineuse, soit 10^6 à 5×10^6 hématies.

- Trichomonas vaginalis est cultivé sur du bouillon V de formule suivante :

Foie de lapin ou de vache	15	g
Polypeptone	2	g
NaCl	0,5	g
Cystéine (chlorhydrate)	0,2	g
Maltose	1	g
Eau distillée	100	ml
ajusté à pH = 5,6.		

- Chaque souris, préalablement traitée comme il vient d'être dit, reçoit alors 0,5 ml de culture pure par voie intrapéritonéale. Les animaux meurent dans la proportion de 70 pour 100, entre le quatorzième et le quarantième jour ; de nombreux flagellés sont présents dans le liquide ascitique qui s'est collecté dans la cavité péritonéale.

Les animaux non traités par les hématies de poulet ne développent pas d'infestation aussi importante et parviennent à survivre.

Les auteurs se sont assurés que ces parasites observés dans les souris infestées sont des flagellés provenant d'une multiplication et ne sont pas de simples survivants.

De plus, la réinjection intrapéritonéale à des souris, neuves et non traitées par les hématies de poulet, de 0,5 ml de l'ascite, fournie par les animaux précédents et contenant à peu près 5×10^5 parasites par ml, détermine, cette fois, une évolution rapidement mortelle, en 3 à 5 jours, pour tous les animaux.

Ces passages d'animal infesté à animal neuf peuvent être répétés et permettent d'observer, chaque fois, une mortalité très importante.

De plus, selon les auteurs, les flagellés retirés de tels animaux ont acquis la possibilité d'être cultivés dans du bouillon F, de formule :

Viande	37,5 g
Polypeptone	1,0 g
Glucose	1,0 g
NaCl	0,5 g
Eau distillée	100 ml

Sérum de Lapin ou de Vache inactivé.. q.sp. 10 p. 100 dans lequel Trichomonas vaginalis ne peut être conservé dans les conditions normales.

Les essais effectués à partir des cultures d'un individu unique ont toujours abouti à la même conclusion.

Enfin, cette modification de comportement s'accompagne de variations morphologiques telles que les auteurs affirment qu'ils ne retrouvent plus, chez les flagellés évoluant dans le F-bouillon, les caractéristiques de Trichomonas vaginalis mais celles de Trichomonas foetus, à savoir trois flagelles antérieurs, une longue membrane ondulante et un flagelle postérieur libre. Or, Trichomonas foetus, au contraire de Trichomonas vaginalis, peut très bien être cultivé dans le bouillon F.

Il faut ajouter qu'en 1964, GEORGES (25), reprenant

les expériences d'INOKI et HAMADA, n'a jamais pu faire les mêmes constatations et observe toujours, chez les flagellés retrouvés dans les souris parasitées, les caractéristiques morphologiques typiques de Trichomonas vaginalis. Plus récemment, JIROVEC a abouti aux mêmes conclusions.

HAMADA (30), étudiant le développement des effets de l'infestation chez des souris parasitées par 2, 3 à 4×10^6 flagellés, distingue deux types différents d'évolution.

Type I. L'infestation se localise à la cavité abdominale qui apparaît distendue par une ascite abondante. La mort survient entre le quatrième et le quarantième jour.

Type II. Il est caractérisé par la présence d'abcès généralement localisés au foie, plus rarement entre les anses intestinales. Les animaux meurent entre le douzième et le quarantième jour.

Les souris traitées aux hématies de poulet par voie intraveineuse et ensuite infestées ne meurent que dans la proportion de 35 p. 100.

Certains auteurs se sont intéressés à la relation existant entre le nombre de flagellés injectés et la réussite de l'infestation.

Pour TERAS (100) et VERSHINSKY (111), la dose habituelle d'infestation se situe entre 1,5 et 4×10^6 flagellés. Pour NIGESSEN (79), la D.L. 50 est d'environ $1,75 \times 10^6$ flagellés. Toutes ces données sont naturellement influencées par le pouvoir pathogène propre à chaque souche, comme l'a montré IWAII (47).

A noter que, dès 1958, VAISMAN et HAMELIN (108), se servent aussi de l'infestation par voie intrapéritonéale pour l'essai de trichomonacides.

BOGOVSKY et TERAS (12) étudient les relations qui peuvent exister entre les manifestations cliniques de la trichomonase chez les malades et le pouvoir pathogène que la même souche développe chez la Souris infestée avec 4×10^6 parasites.

En règle générale, les souches isolées chez des patientes souffrant de vaginites aiguës ou subaiguës se montrent plus virulentes pour la Souris que celles qui proviennent de malades atteintes de vaginite chronique. Cette correspondance est ultérieurement retrouvée par HONIGBERG (41) qui utilise la voie sous-cutanée comme mode d'infestation.

Dans le même ordre d'idées, REARDON, ASHBURN et JACOBS (84) éprouvent 13 souches de Trichomonas vaginalis responsables, chez la femme, d'atteintes de gravité variable.

Après inoculation intrapéritonéale à la Souris, ils constatent qu'une de ces souches (C), fournie par une femme présentant une vaginite sévère, provoque régulièrement la mort des animaux inoculés avec des doses de 10^7 flagellés. En revanche, une autre souche (R), provenant d'une trichomonase bénigne, se montre incapable, dans les mêmes conditions, d'entraîner la mort des souris au cours d'expériences parallèles.

Dans leurs conclusions, les mêmes auteurs adoptent une position plus nuancée que celle d'HONIGBERG (37) et de BOGOVSKY et de TERAS (12) qui affirmaient une corrélation étroite entre les manifestations cliniques de la vaginite et le pouvoir pathogène chez la Souris.

Ils soulignent, quant à eux, qu'en raison des multiples facteurs impliqués, le degré d'infestation chez un malade peut

être en corrélation aussi bien avec la résistance de l'individu qu'avec le pouvoir pathogène de la souche. Enfin, comme KULDA (54) le montrera plus tard par voie sous-cutanée, REARDON et collaborateurs trouvent des différences de sensibilité entre plusieurs souches de souris.

En 1966, TERAS et ROIGAS (104) publient une étude comparée portant sur 171 souches récemment isolées. Parmi elles, 43 p. 100 se montrent fortement pathogènes, 44 p. 100 sont également virulentes mais à un degré moindre, alors que 13 p. 100 ont un comportement peu agressif.

Selon JIROVEC et PETRŮ (52), aucune souche parfaitement inoffensive n'a encore été isolée. Chaque degré de virulence correspond, chez la Souris parasitée, à un tableau caractéristique. Dans les formes les plus graves, il s'agit d'une péritonite fibrineuse et purulente, surtout localisée à la région hépatique et splénique. Est également typique le conglomérat qui rassemble le foie, l'estomac, la rate, le pancréas et les ganglions lymphatiques. Tous ces viscères sont recouverts d'un exsudat purulent dans lequel s'observent de nombreux leucocytes et des flagellés. On remarque également la présence de foyers abcédés localisés sur les mésentères et le péritoine, de consistance caséuse, contenant, eux aussi, des parasites et des leucocytes.

A noter aussi un pouvoir nécrosant vis à vis du foie d'autant plus accusé que la souche intéressée est plus virulente.

La mort peut survenir en 5 à 8 jours.

Les formes correspondant aux souches de pouvoir pathogène moyen présentent, elles aussi, une péritonite fibrineuse où l'exsudat est peu abondant. L'atteinte viscérale est plus rare et plus tardive. L'estomac, le pancréas et les ganglions lymphatiques sont le plus souvent épargnés. La mort survient en 3 semaines ou plus.

L'inoculation des souches à faible virulence ne provoque qu'une faible réaction exsudative. Les souris meurent au bout de 4 à 8 semaines.

TERAS (102) constate que ni le pouvoir pathogène de Trichomonas vaginalis vis à vis des animaux, ni les formes cliniques de l'infestation du tractus génito-urinaire n'ont une corrélation avec le sérotype.

Les rares renseignements concernant l'étude des lésions que nous venons de décrire sont dus à REARDON et collaborateurs (84).

L'invasion hépatique semble aborder d'abord le hile et se développer de façon centrifuge. La vague d'invasion est précédée d'une zone de réaction leucocytaire et laisse derrière elle un parenchyme plus ou moins nécrosé.

Sur le bord avancé du processus, il y a toujours un alignement de parasites et, juste à proximité, une zone de cellules inflammatoires infiltrées, principalement des leucocytes polynucléaires.

Il faut noter l'absence dans la littérature de données concernant les répercussions biochimiques de l'endoparasitisme chez les souris infestées.

Notre travail expérimental est exposé et discuté dans l'ordre suivant :

- Nous rapporterons d'abord les tentatives d'endoinfestation de la Souris par Trichomonas vaginalis où sont envisagés les premiers traitements qui appliqués à la Souris ou au parasite sont capables d'assurer l'intallation et la prolifération du flagellé :

- nous étudierons ensuite les phénomènes pathologiques déterminés chez la Souris par l'endoparasitisme. Ces désordres sont étudiés sur le plan cytologique, histologique, histochimique et biochimique :

- Nous nous attacherons alors à étudier de façon précise le pouvoir pathogène propre des souches dont nous disposons et à apprécier son évolution en fonction de diverses circonstances expérimentales. A partir de ces données nous essaierons de dégager une expression objective de ce pouvoir pathogène et de ses fluctuations :

- Nous tenterons enfin de proposer une utilisation possible de nos observations en vue de l'essai des médicaments trichomonacides et de formuler quelques conclusions à propos de l'évolution d'un parasite contraint à vivre chez un hôte anormal dans des conditions différentes de celles qui lui sont habituelles.

CHAPITRE II

Trichomonas vaginalis endoparasite de la Souris.

Etude préliminaire des conditions d'installation.

Nous avons déjà rapporté que les travaux publiés antérieurement à propos de l'infestation par la voie intrapéritonéale, appartiennent à deux catégories.

Les uns procèdent par inoculation directe, unique et massive de flagellés provenant de cultures amicrobiennes. La mise en oeuvre d'inoculats comptant entre $1,5 \times 10^6$ et 4×10^6 flagellés a permis à TERAS (100) et à VERSHINSKY (111) de fixer la D.L. 50 aux environs de $1,75 \times 10^6$ et de provoquer, chez les animaux inoculés, des lésions tissulaires telles qu'une péritonite avec exsudat fibrineux et foyers nécrotiques au niveau du foie, du pancréas, de la rate et d'autres organes abdominaux. Selon les auteurs, la gravité des accidents est fonction du pouvoir pathogène que les souches en question exercent chez les femmes sur lesquelles elles ont été prélevées. [BOGOVSKY et TERAS (12), REARDON, ASHBURN et JACOBS (84)].

On comprend donc qu'il est difficile de fixer à l'avance un nombre de flagellés à injecter pour obtenir des lésions et qui soit valable quelle que soit la souche utilisée.

La deuxième catégorie groupe les expériences d'INOKI et HAMADA (45) dans lesquelles des souris reçoivent d'abord, par voie intraveineuse, des hématies de Poulet et, quelques jours plus tard, une injection intrapéritonéale de Trichomonas vaginalis. Les animaux ainsi traités meurent dans la proportion de 70 p. 100 entre le quatorzième et le quarantième jour suivant l'inoculation. D'autre part, les flagellés qui se sont multipliés chez l'animal semblent avoir acquis une virulence particulière ; en effet, prélevés sur des animaux infestés puis inoculés à des animaux neufs et non préparés, ils se montrent alors hautement pathogènes puisqu'ils provoquent la mort des souris en cinq à sept jours.

De plus, les mêmes auteurs affirment que ces flagellés, remis en culture, montrent du point de vue cultural et cytologique, des modifications permettant de conclure que Trichomonas vaginalis dont ils étaient partis s'était transformé en Trichomonas foetus.

On comprend pourquoi ces travaux nous ont semblé mériter certains éclaircissements. Nous nous sommes d'abord attaché à fixer les conditions expérimentales tenant à la préparation de l'animal à infester, en l'espèce la Souris, et à la souche de Trichomonas vaginalis servant à l'infestation.

Les points que nous avons particulièrement retenus sont les suivants :

- appréciation du rôle assuré par les hématies de Poulet ; s'agit-il d'un agent spécifique, ou, au contraire, ce matériel fait-il partie d'un groupe de moyens de préparation favorisant la réceptivité ultérieure de l'animal vis à vis de Trichomonas vaginalis ?

- étude de l'exaltation du pouvoir pathogène des flagellés prélevés sur des souris préparées.

Le tropisme particulier que le flagellé semble posséder pour certains organes nous a amené à tenter sa culture in vitro, en présence de cellules provenant des dits organes, dans l'espoir que leur contact pourrait conférer aux flagellés cultivés, la virulence qu'ils auraient acquise après séjour chez la Souris.

I. Matériel et méthodes

A - Préparation des souris

Nous avons travaillé sur des souris blanches femelles, exemptes de contamination bactérienne. Elles sont âgées de 5 à 6 semaines au moment de l'injection des flagellés et pèsent 18 à 20 grammes.

Comme toutes les souris qui seront utilisées pour l'ensemble de ce travail, elles sont l'objet d'une surveillance quotidienne très étroite et de soins attentifs, rendus possibles par leur installation dans le laboratoire même.

1. Injection préliminaire par voie intraveineuse d'hématies de Poulet.

Celles-ci ont été recueillies par ponction de la veine de l'aile d'une poule Leghorn, dans une seringue héparinée. Le prélèvement sanguin est ensuite centrifugé à 2000 tours par minute et le culot d'hématies est lavé à 2 reprises dans du soluté isotonique de chlorure de sodium. Le nombre d'hématies dans la suspension finale est estimé à l'hématimètre de Malassez et une dilution convenable est éventuellement effectuée afin d'injecter, dans une veine de la queue de la souris, le nombre d'hématies désiré sous un volume de 0,2 ml.

Ultérieurement, pour des raisons de commodité, nous avons substitué aux hématies de Poulet adulte des hématies d'embryon de Poulet. Celles-ci sont obtenues en prélevant stérilement, dans un oeuf incubé de 12 jours, le liquide allantoïdien dans lequel on a fait s'écouler le sang obtenu par section de la membrane chorio-allantoïdienne. Les hématies embryonnaires ainsi recueillies sont traitées comme il est dit plus haut à propos des hématies de Poulet adulte.

2. Hématies humaines A, Rh⁺.

C'est un matériel non nucléé alors que les hématies d'oiseaux sont nucléées. Leur comptage et l'injection intraveineuse se font dans les mêmes conditions que précédemment. Les souris reçoivent, 48 heures après, $2,5 \times 10^5$ flagellés par voie intrapéritonéale.

3. Trichomonas vaginalis.

Ici, pour l'injection préparante intraveineuse, nous remplaçons les hématies par des flagellés appartenant à la même souche S₁₂ que ceux utilisés plus tard pour l'infestation et cela dans les mêmes conditions que les hématies. Les souris reçoivent, 48 heures après, $2,5 \times 10^5$ flagellés par voie intrapéritonéale.

4. Azathioprine (Imurel^{*}).

Nous avons administré ce produit, par voie buccale, sous la forme d'une suspension dans du sirop de gomme. La dose ingérée est de 2 mg p. kg les 2 premiers jours et 1 mg p. kg le troisième jour. 24 heures après la troisième prise, les souris reçoivent, par voie intrapéritonéale, $2,5 \times 10^5$ flagellés.

B - Souches de Trichomonas vaginalis utilisées

Nous avons utilisé différentes souches de Trichomonas vaginalis, répertoriées S₈, S₁₂, S₁₃, S₁₄, toutes prélevées directement sur des femmes atteintes de vaginite et non encore traitées. Le temps de conservation en culture, avant notre expérimentation, varie pour chacune de ces souches. Il est au moment de ces travaux de :

- 10 ans pour S₈
- 12 mois pour S₁₂
- 9 mois pour S₁₃
- 8 mois pour S₁₄ .

Les flagellés de la souche choisie sont recueillis à partir de cultures entretenues sur milieu de Magara et âgées de 48 heures sont lavés à 2 reprises avec du soluté isotonique de glucose puis comptés à l'aide d'une cellule de Malassez et dilués de façon convenable, avant d'être injectés en nombre connu, par voie intrapéritonéale, sous un volume de 0,5 ml.

LES FLAGELLÉS, REPIQUÉS RÉGULIÈREMENT, NON TRAITÉS IN VITRO ET N'AYANT PAS SUBI DE PASSAGE CHEZ L'ANIMAL, SONT QUALIFIÉS DE NORMAUX ; LA SOUCHE CORRESPONDANTE EST DITE SOUCHE NORMALE.

C - Milieu de culture et procédés d'utilisation

Nous avons utilisé de façon constante le milieu de MAGARA (66) qui comprend :

- | | |
|-----------------------|--------------|
| - Bouillon V.F. | 500 ml. |
| - Glucose isotonique | 50 ml. |
| - Sérum de poulain | 50 ml. |
| - Pénicilline | 500.000 U.I. |
| - pH ajusté par HCl à | 5,8 . |

- Le bouillon est constitué par une digestion chlorhydrique de viande et de foie de boeuf ; il est délivré, ajusté à pH 7,4 et glucosé à 0,2 p. cent, par l'Institut Pasteur.

- Selon les besoins, les flagellés sont cultivés dans 3 sortes de récipients :

- Tubes de Hall comportant une bille de verre pour éviter le contact avec l'air et contenant 6 ml de milieu en dessous de la bille ;

- Seringues de 50 ml et 100 ml, entièrement remplies et bouchées pour conserver l'anaérobiose ; quand la pression des gaz dégagés par les flagellés augmente, le piston de la seringue est légèrement repoussé **vers l'arrière**.

- Flacons de Roux de 670 ml, 735 ml et 1120 ml entièrement remplis et munis d'un bouchon solidaire d'une ampoule de verre assurant l'expansion du milieu sous la poussée des gaz dégagés au cours de l'incubation. Ce système évite l'éclatement du flacon.



Chaque flacon estensemencé à l'aide du contenu d'un ou deux tubes de Hall correspondant à la souche choisie ; les flagellés, au bout de 36 à 48 heures, forment un tapis très dense au fond du flacon.

Le milieu de culture contenu dans un flacon de 670 ml fournit environ 1 gramme de **flagellés**, en poids frais.

Le rendement peut être augmenté en omettant l'addition d'HCl et en prévenant l'acidification en cours de culture par l'introduction, dans l'ampoule, de 5 ml d'une solution de carbonate acide de sodium à 0,2 p. 100.

D - Réinoculation, à des animaux neufs, des flagellés prélevés sur des animaux infestés

Au début de nos travaux, les flagellés provenaient du liquide ascitique dilué ou de lésions viscérales homogénéisées au mortier au sein de soluté isotonique de glucose.

Ultérieurement, nous avons remplacé la transmission directe de souris à souris par un ou deux passages intermédiaires sur milieu de Magara en tube de Hall. Le contenu de chaque tube est additionné d'une goutte d'une solution de 50 mg d'Amphotéricine B (Fungizone*) dans 10 ml d'eau. Comme nous le verrons, cette technique permet d'éliminer tout risque de contamination associée.

E - Culture des souches S₁₂, S₁₃, S₁₄, en présence de broyats hépatiques ou pancréatiques

On prélève environ 1 g de foie ou de pancréas sur une souris saine ; on broie l'échantillon au mortier et on le reprend par 3 ml de soluté isotonique de glucose. On ajoute environ 0,5 ml

de cette suspension à un tube de Hall qui vient d'être ensemencé. On repique cette culture au bout de 48 heures, cette fois sans nouvelle addition de matériel hépatique ou pancréatique.

II. Résultats

A - Utilisation des hématies de Poulet

Nous avons voulu étudier les points expérimentaux suivants :

- influence du nombre d'hématies injectées ;
- influence du nombre de flagellés injectés ;
- influence de l'intervalle ménagé entre l'injection d'hématies et l'injection de flagellés.

1. Influence du nombre d'hématies injectées.

En ce qui concerne ce premier point, les essais auxquels nous nous sommes livré ont donné les résultats suivants :

Tableau 3

Nombre d'hématies	Nombre de T.V. Souche S ₁₂	Intervalle entre les 2 injections	Résultats
1,5 . 10 ⁶	250.000	3 jours	4 ⁺ /5
3 . 10 ⁶	-	3 jours	3 ⁺ /5
5 . 10 ⁶	-	7 jours	1 ⁺ /3
6 . 10 ⁶	-	3 jours	4 ⁺ /15

Nous avons donc retenu le nombre $1,5 \cdot 10^6$ hématies par animal comme le plus convenable. Nous reviendrons, cependant, plus tard sur ce point.

2. Influence de l'intervalle ménagé entre l'injection d'hématies et l'injection de flagellés.

Nos essais nous ont permis d'observer les faits résumés dans le tableau 4.

Tableau 4

Intervalle entre les 2 injections	Réussite	Echec
0		+
24 h		+
48 h	+	
72 h	+	
7 jours	inconstante	

Nous avons retenu un intervalle de 48 à 72 heures entre l'injection préparante d'hématies de Poulet et l'injection infestante.

3. Influence du nombre de flagellés injectés

a) Chez des animaux non préparés

Nous avons groupé nos résultats dans le tableau 5.

Tableau 5

Nombre, par lot, d'animaux infestés avec succès après avoir reçu entre :					
Souches	1.10^5 et 2.10^5	2.10^5 et 4.10^5	4.10^5 et $5,5.10^5$	$5,5.10^5$ et $1,5.10^6$	$1,5.10^6$ et $2,5.10^6$
S_8		0/10 $2,5.10^5$	0/16 5.10^5	0/12 1.10^6	
S_{12}	0/12 1.10^5	0/17 3.10^5	0/20 $4,25.10^5$		$2^+/10$ 2.10^6
S_{13}		0/5 2.10^5	0/5 4.10^5	$1^+/25$ 1.10^6	
S_{14}	0/6 $1,5.10^5$	0/15 $2,75.10^5$	0/10 $5,5.10^5$		$1^+/20$ 2.10^6

A partir de ces résultats, nous dégagons les données suivantes :

- Le pourcentage global d'infestation est très faible : 2,7 p. 100.
- L'inoculation d'un nombre relativement faible de flagellés n'est pas suivi de succès chez des souris non préparées.
- Les résultats positifs sont groupés dans les lots d'animaux ayant reçu entre $5,5.10^5$ et $2,5.10^6$: le pourcentage de réussite y est encore modeste et voisin de 6 p. 100.

b) Chez des animaux préparés
.....

Les résultats obtenus font l'objet du tableau 6.

Tableau 6

Nombre, par lot, d'animaux infestés avec succès après avoir reçu entre :				
Souches	et 1.10^5 2.10^5	et 2.10^5 4.10^5	et 4.10^5 $7,5.10^5$	et $7,5.10^5$ $1,5.10^6$
S_8		0/10 3.10^5	0/12 5.10^5	0/12 1.10^6
S_{12}	$1^+/15$ 1.10^5	$11^+/25$ 3.10^5		
S_{13}			$3^+/5$ $7,5.10^5$	
S_{14}			$3^+/5$ $7,5.10^5$	

A partir de ces résultats, nous pouvons faire les observations suivantes :

- La préparation des souris augmente le pourcentage global d'infestation, 17 animaux infestés sur 84 soit 20 p. 100.
- Si on ne compte pas les essais effectués en utilisant la souche S_8 qui, nous le verrons, présente un cas particulier, le pourcentage s'élève à 34 p. 100 ; ce pourcentage est voisin de celui obtenu par HAMADA (30).

Certains lots, en particulier ceux infestés avec les souches S_{13} et S_{14} , sont d'importance numérique faible ; ils ne visent qu'à prouver que le phénomène décrit par INOKI est valable avec des souches différentes et aussi à obtenir des flagellés "pathogènes" de diverses origines.

B - Utilisation d'autres agents de préparation

1. Hématies humaines A, Rh⁺, par voie intraveineuse.

Nous avons pu obtenir, après inoculation intrapéritonéale de 250.000 flagellés de la souche S₁₂, 3 souris parasitées sur 11. Comme les hématies humaines, à l'encontre de celles des oiseaux, sont anucléées, ces résultats tendent à prouver que le phénomène ne dépend ni de la constitution des hématies ni de leur origine zoologique.

2. Trichomonas vaginalis, de souche homologue (S₁₂) par voie intraveineuse.

L'utilisation d'un tel matériel de préparation est fondée sur une éventuelle sensibilisation de l'animal qui serait rendu ainsi plus réceptif à l'inoculation ultérieure.

Les conditions d'expérimentation sont les mêmes que celles retenues pour les hématies, à savoir $1,5 \cdot 10^6$ éléments cellulaires inoculés 48 heures avant l'infestation intrapéritonéale proprement dite.

Nous obtenons ainsi des résultats incontestablement positifs bien qu'irréguliers allant d'un animal parasité sur 5 à 6 animaux parasités sur 9.

Cependant, quelques observations faites ultérieurement, viennent nuancer l'interprétation des résultats que nous venons d'exposer.

En effet, après inoculation unique de $1,5 \cdot 10^6$ flagellés par voie intraveineuse des souches S₈, S₁₂, S₁₃, S₁₄, non suivie d'une inoculation intrapéritonéale, nous avons eu l'occasion de

retrouver chez les souris ainsi traitées , dans les proportions indiquées par le tableau 7, de petits abcès au niveau du foie et du pancréas. Certains de ces abcès présentaient des flagellés mobiles ; dans d'autres, en revanche, n'existaient que des formes arrondies, souvent de grande taille (20 à 30 μ) et immobiles.

Or, ces formes, repiquées dans du milieu de Magara, permettaient d'obtenir des cultures florissantes au bout de quelques jours. Nous aurons l'occasion de reparler plus loin de ces formes latentes à propos des essais qui seront menés avec la souche S_8 .

Tableau 7

1,5.10 ⁶ T.V. injectés uniquement par voie veineuse		
Souches	Résultats	
S_8	0/10	
S_{12}	2 ⁺ /10	très faiblement parasitées
S_{13}	0/10	
S_{14}	4 ⁺ /20	très faiblement parasitées

Nous pouvons préciser que Trichomonas vaginalis, inoculé par voie intraveineuse, ne demeure dans le sang que pendant une période voisine de 2 heures, comme l'ont prouvé les repiquages de contrôle effectués d'heure en heure avec le sang des animaux infestés (ensemencement de III gouttes de sang prélevé à l'extrémité de la queue). Les cultures restent négatives pour les prélèvements effectués à partir de la troisième heure suivant l'inoculation.

Il est intéressant de signaler que ce temps de séjour sanguin semble prolongé si les souris sont endormies à l'aide de pentobarbital (Nembutal *), à la dose d'environ 1,5 mg pour une souris de 20 g, administrée par voie intrapéritonéale. Dans ces conditions, les flagellés ont pu être retrouvés jusqu'à 6 heures après leur inoculation.

3. Azathioprine par voie buccale.

- - - - -

Dans l'hypothèse où l'injection de cellules étrangères serait capable de provoquer, chez les souris, un blocage ou un affaiblissement des systèmes immunitaires, il nous a semblé logique d'utiliser, pour la préparation des animaux, un produit immunodépresseur dont il est fait désormais un usage fréquent en chirurgie, à l'occasion des tentatives de greffes d'organes.

Dans ces conditions, quelle que soit la souche utilisée (S_{12} , S_{13} ou S_{14}), 30 p. 100 des animaux sont trouvés porteurs de lésions entre le treizième et le vingtième jour.

C - Réinoculation des flagellés après passage chez l'animal

Cette réinoculation se pratique chez des souris neuves et non préparées, avec des parasites prélevés sur des animaux infestés.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 8. Ils concernent les animaux systématiquement sacrifiés au plus tard le quinzième jour après l'infestation.

Tableau 8

Nombre, par lot, d'animaux infestés avec succès après avoir reçu entre :				
Souches	et 1.10^5 2.10^5	et 2.10^5 4.10^5	et 4.10^5 5.10^5	et 5.10^5 1.10^6
S_8				
S_{12}	$3^+/11$ 1.10^5	$9^+/12$ $2,25.10^5$	$43^+/53$ $4,5.10^5$	$8^+/9$ $8,75.10^5$
S_{13}	$0/10$ 1.10^5	$3^+/20$ $2,5.10^5$	$4^+/9$ 5.10^5	$4^+/10$ 1.10^6
S_{14}	$0/5$ $1,25.10^5$	$2^+/5$ $2,5.10^5$		$8^+/10$ $5,5.10^5$

Les commentaires suscités par ces résultats sont les suivants :

- 84 animaux ont été réellement infestés sur les 154 inoculés, ce qui correspond à un pourcentage de 54,5 p. 100 ;
- en inoculant entre 1.10^5 et 5.10^5 flagellés, nous obtenons un taux d'infestation de 51 p. 100 ;
- au-delà de 5.10^5 , ce taux atteint 69 p. 100 ;
- l'utilisation d'un très faible contingent de flagellés, de l'ordre de 20.000 de la souche S_{12} , aboutit à un résultat négatif chez 10 souris expérimentées.

L'importance de la nature de la souche, signalée par plusieurs auteurs dont HONIGBERG (37), TERAS et ROIGAS (104) et LAAN (58), apparaît dans la comparaison des résultats respectivement obtenus pour chacune d'entre elles.

S_8 : aucun résultat positif puisque l'infestation de souris préparées s'est révélée impossible ;

S_{12} : 63 animaux sur 85 soit 74 p. 100 ;

S_{13} : 11 animaux sur 49 soit 22,5 p. 100 ;

S_{14} : 10 animaux sur 20 soit 50 p. 100.

CES SOUCHES AYANT SUBI UN PASSAGE CHEZ L'ANIMAL ET AYANT PROVOQUÉ UNE INFESTATION SONT DITES PATHOGENES.

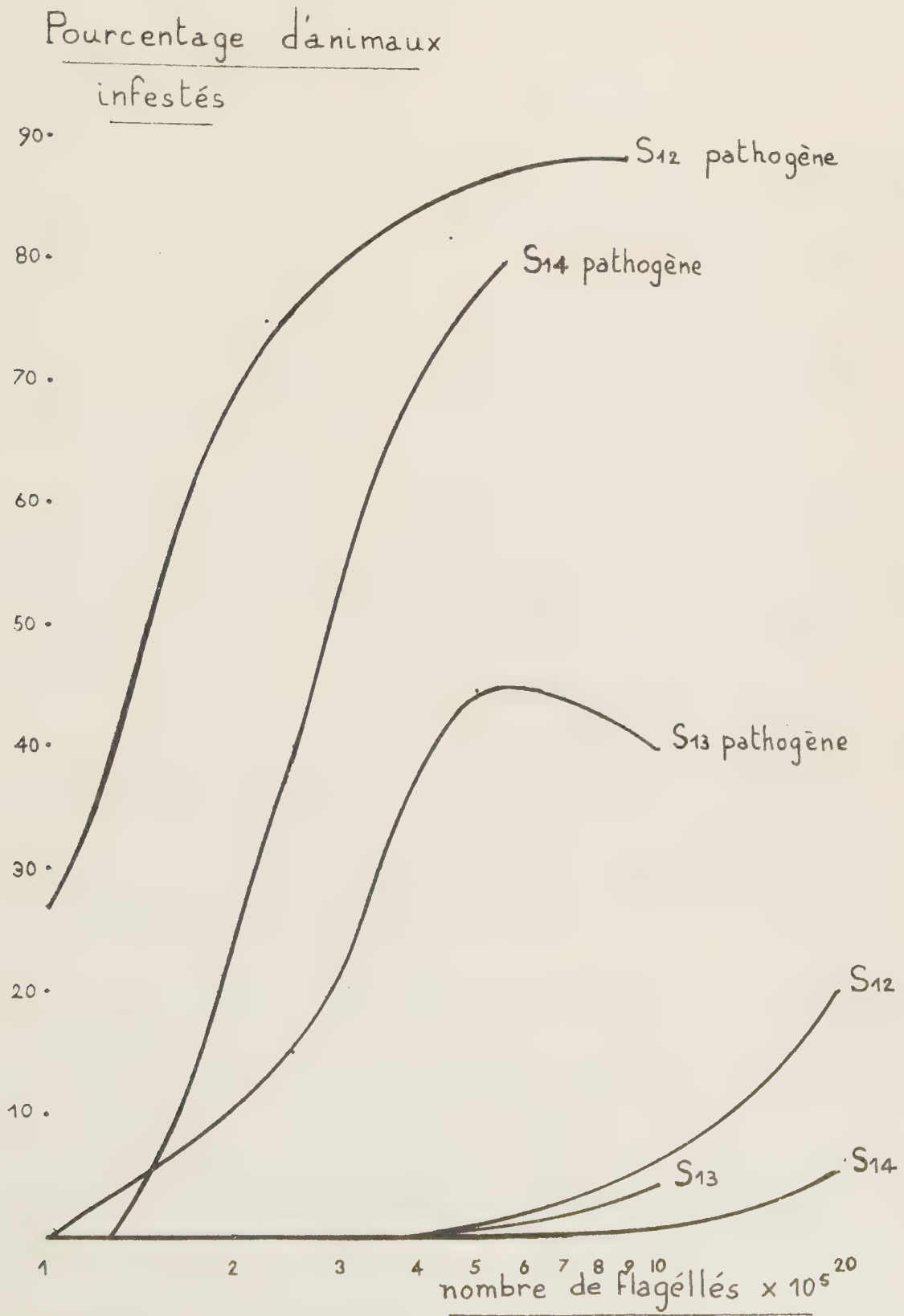
On pourra lire, sur les courbes de la figure 2, les variations du caractère pathogène des souches S_{12} , S_{13} et S_{14} .

D - Traitement des souches S_{12} , S_{13} , S_{14} , par des broyats de cellules hépatiques ou pancréatiques

Dans l'ensemble des 55 souris infestées avec la souche S_{12} préalablement cultivée au contact de tissu hépatique ou pancréatique, 7 se révèlent positives soit sensiblement 12 p. 100. Mais les résultats ne sont pas constants entre les différents lots.

Il en est de même pour les souches S_{13} et S_{14} avec lesquelles nous notons respectivement 1 souris positive sur 20 et 2 souris sur 20.

Figure 2



III. Discussion

Ainsi, dans l'ensemble des premiers résultats que nous venons d'exposer, nous pouvons conclure que le phénomène décrit par INOKI n'est pas à attribuer à un facteur spécifique, en l'espèce les hématies de Poulet. On peut le reproduire en utilisant d'autres agents de préparation dont le seul dénominateur commun paraît être lié à une dépression des systèmes immunitaires de la Souris, comme semble le prouver l'action de l'azathioprine.

Chez les souris préparées avec les hématies de Poulet et ultérieurement infestées, nous avons pu retrouver les phénomènes déjà décrits par INOKI. Pour les animaux ayant reçu environ 5.10^5 flagellés, l'évolution de l'infestation se déroule sur 15 à 40 jours au long desquels les animaux infestés meurent dans la proportion de 50 à 70 p. 100.

A l'autopsie, la cavité abdominale apparaît parfois plus ou moins remplie d'un liquide ascitique, fibrineux, dans lequel on peut observer des flagellés, mobiles et nombreux.

Au niveau des organes, foie et pancréas, et des mésentères, il est facile de repérer des lésions abcédées, variables en taille et en nombre.

L'étude cytologique, histologique et histochimique, détaillée de ces lésions fera l'objet d'un prochain chapitre.

Le processus infectieux, observable chez les animaux infestés par les flagellés ayant déjà séjourné chez l'animal, se déroule de façon différente ; les protozoaires sont doués d'emblée d'une virulence qui, non seulement n'a pas besoin d'agent préparant pour se manifester, mais encore provoque, en un temps plus

réduit (5 à 10 jours) des lésions viscérales sévères, souvent rapidement mortelles. Ce passage à des souris non préparées peut être répété à plusieurs reprises en observant dans les lots successifs des infestations qui peuvent atteindre les trois-quarts des animaux en expérience.

Ce changement de comportement biologique ne s'accompagne pas de modifications morphologiques telles que celles qu'ont pu rapporter INOKI et HAMADA (45). Nous n'avons jamais observé l'apparition de caractères cytologiques et culturels qui puisse légitimer l'assertion des auteurs japonais selon laquelle le passage chez la Souris transformait Trichomonas vaginalis en Trichomonas foetus. Nos observations négatives rejoignent celles de GEORGES (25) et celles que nous a communiquées JIROVEC.

Si les flagellés pathogènes sont cultivés in vitro, ils gardent au cours de leur multiplication la virulence qu'ils avaient acquise chez la Souris.

- Le caractère pathogène semble capable de se maintenir en culture au cours de repiquages successifs sans qu'il soit besoin d'intercaler trop fréquemment un passage sur l'animal.

- C'est ainsi que la souche S₁₂, prélevée sur une lésion le 7 Août, se montre encore virulente le 28 Novembre et qu'une autre, mise en culture le 7 Novembre, est encore infectieuse le 24 Mars pour deux-tiers des animaux.

Tous ces résultats restent valables, aux variations expérimentales près, si l'on a soin d'utiliser lors, de l'injection infestante, une culture vigoureuse aux trophozoïtes bien mobiles.

Rappelons, sans pour autant en discuter immédiatement, que la souche S_8 , conservée depuis 10 ans au laboratoire, s'est jusqu'ici refusée à développer un pouvoir pathogène dans les conditions d'expérience que nous venons de décrire alors que, 8 ans auparavant, GEORGES (25) avait obtenu avec elle des résultats positifs. Cette perte de pouvoir pathogène est peut-être due, en partie tout au moins, à l'antibiotique présent dans le milieu comme ont pu le constater STABLER, HONIGBERG et KING (99).

Remarquons, dans le tableau 7 p. 48 , qu'après injection intraveineuse, les différentes souches se rangent toujours dans le même ordre de virulence, celle-ci s'exprimant d'ailleurs à une échelle beaucoup plus modeste. Le foie et le pancréas sont, là encore, les organes-cibles.

La dose infestante le plus souvent utilisée dans nos travaux ultérieurs est de 250.000 flagellés ; elle a été retenue pour les raisons suivantes :

- pour être certain qu'aucune lésion ne se produit chez des souris neuves lorsqu'on leur injecte des souches normales, n'ayant pas au préalable séjourné chez l'animal ;
- pour avoir constaté qu'avec cet effectif, on peut obtenir des souris porteuses de lésions, soit en préparant les souris elles-mêmes, soit en utilisant des souches rendues pathogènes.

L'utilisation de cette dose infestante doit donc nous permettre d'interpréter avec sécurité les résultats positifs ou négatifs obtenus au cours de nos expériences ultérieures.

Cependant, quelque temps après cette étude préliminaire, apparaît une difficulté : l'apparition, dans certains lots infestés avec 250.000 flagellés normaux des souches S_{12} et S_{14} , de quelques animaux porteurs, contre toute attente, de lésions modestes certes, mais qui nous amènent à mettre au point un procédé d'appréciation du parasitisme rendant mieux compte des nuances et de l'importance des infestations.

En ce qui concerne les résultats obtenus avec les flagellés cultivés au contact d'un broyat tissulaire, nous estimons que leur irrégularité est attribuable à une durée de contact mal ajustée. C'est du moins la conclusion à laquelle nous avons abouti à la lueur des observations faites ultérieurement et c'est ce qui nous a amené à modifier et à préciser notre protocole opératoire concernant les contacts que l'on peut mettre en oeuvre in vitro.

IV. Conclusion

- A - Il est possible d'implanter Trichomonas vaginalis avec un inoculum faible, de l'ordre de $2,5.10^5$ flagellés, à condition que l'animal ait subi une préparation ;
- B - Les hématies de Poulet ne constituent pas un agent de préparation spécifique puisque des résultats positifs sont obtenus en utilisant des hématies humaines, Trichomonas vaginalis lui-même ou un immunodépresseur. Sans doute la préparation des animaux par des agents aussi différents fait-elle intervenir un mécanisme qui est, en partie du moins, de nature immunitaire.

- C - Ces éléments expérimentaux nous ont permis de constater, chez Trichomonas vaginalis, la possibilité de provoquer, chez l'animal, des lésions tout à fait différentes en nature et en gravité des phénomènes pathologiques dont il est responsable dans son biotope habituel.
- D - La possibilité de transformation de Trichomonas vaginalis en Trichomonas foetus, qui avait été avancée, n'a pas été retrouvée.
- E - Le pouvoir pathogène acquis par les souches qui ont pu être installées chez la Souris représente un caractère transmissible au cours de leur multiplication en culture et relativement stable dans le temps.
- F - Les diverses souches de Trichomonas vaginalis étudiées ont manifesté, de l'une à l'autre, un comportement différent ; alors que les souches S_{12} , S_{13} , S_{14} , nous ont permis des observations positives, la souche S_8 s'est refusée à tout développement chez la Souris. Nous reviendrons ultérieurement sur le problème que pose cet état réfractaire.
- G - Nous avons abordé l'étude du traitement in vitro du flagellé pour tenter de le rendre directement infestant pour la Souris. Tel est l'objet des cultures effectuées au contact des tissus hépatique ou pancréatique. En dépit de l'inconstance des résultats obtenus, nous nous proposons de reprendre ces expériences en modifiant le protocole opératoire et en utilisant d'autres types cellulaires.

CHAPITRE III

Etude cytologique et histologique

des lésions provoquées chez la Souris

par l'endoparasitisme de *Trichomonas vaginalis*.

L'infestation de la Souris par injection intrapéritonéale de *Trichomonas vaginalis*, dans les conditions que nous avons étudiées, provoque, chez les animaux, un endoparasitisme qui s'accompagne de réactions tissulaires facilement visibles à l'autopsie et dont nous rapportons ici l'étude cytologique et histologique.

I. Matériel et méthodes

A - Animaux

Souris blanches âgées de 5 à 6 semaines et d'un poids moyen de 20 grammes.

B - Souches

Utilisation des souches S₁₂ normales et S₁₂ pathogènes.

C - Réactifs

1. Préparation de la trioxyhémateine ferrique :

Solution A :

Dissoudre à froid :

- Alun de fer	10,0 g.
- Sulfate d'ammonium	1,4 g.
- Eau distillée	150 ml.

Solution B :

- Hématoxyline cristallisée	1,6 g.
- Eau distillée	75 ml.

La solution d'hématoxyline est préparée à chaud dans un ballon en pyrex. Après refroidissement, on verse l'alun dans l'hématoxyline (jamais l'inverse) et on porte à ébullition maintenue pendant 30 secondes; on refroidit brusquement. Placer dans un flacon (accessoirement paraffiné à l'intérieur) bien bouché; le colorant se conserve pendant plus d'un an. Toujours filtrer au moment de l'emploi.

2. Préparation du mélange fuchsine-Ponceau :

Solution A :

- Fuchsine acide	1 g.
- Eau	100 ml.
- Acide acétique	1 ml.

Solution B :

- Ponceau de xylidine 1 g.
- Eau 100 ml.
- Acide acétique 1 ml.

On mélange 1 partie de A,
2 parties de B.

3. Préparation du Bleu d'aniline ou du Vert lumière :

- Bleu d'aniline 1 g.
- ou Vert lumière
- Eau 100 ml.
- Acide acétique 1 ml.

4. Préparation des réactifs de différenciation :

- a. - Acide phosphomolybdique 1 g.
- Eau 100 ml.

- b. - Acide acétique 1 ml.
- Eau 100 ml.

D - Protocole opératoire de la coloration trichromique
type Masson. [LANGERON (59)] .

1. Coloration nucléaire par la trioxyhématéine ferrique de Hansen - 1 min.
2. Coloration cytoplasmique par le mélange fuchsine-ponceau - 3-4 min.
3. Rinçage par l'alcool éthylique à 60 p. cent q.s.

4. Différenciation par la solution d'acide phosphomolybdique - 5 à 10 min.

5. Coloration par le bleu d'aniline ou le vert lumière sans rinçage préalable - 1 à 2 min.

6. Différenciation par l'eau acétique - q.s.

7. Déshydratation alcoolique, rinçage au toluène et montage.

II. Résultats

A - Examen macroscopique

Sur le plan macroscopique, le développement de Trichomonas vaginalis dans la cavité péritonéale de la Souris y provoque une péritonite comportant deux éléments :

1. Une ascite.

Sa présence n'est pas constante et son abondance est variable. Quand elle existe, elle se présente sous la forme d'un liquide gris jaunâtre, fibrineux, capable d'une coagulation rapide. Parfois, l'aspect est purulent avec des formations caséeuses en suspension. On peut retirer jusqu'à 4 ml de cette ascite de l'abdomen de certains animaux.

2. Des lésions abcédées ou nécrotiques.

Elles sont nettement visibles à l'ouverture du péritoine, de couleur gris-jaunâtre, localisées au pancréas quand il s'agit d'abcès et au foie s'il s'agit de nécrose, plus rarement au mésentère, avec de nombreuses adhérences. Leur taille est très variable, parfois de la taille d'une tête d'épingle, parfois occupant la



PHOTO 1 - - Lésions viscérales chez une souris infestée:
deux abcès au niveau du pancréas.



PHOTO 2 - - Lésions viscérales chez une souris infestée:
volumineux abcès qui a envahi la presque totalité du lobe gau-
che du foie.

presque totalité d'un lobe hépatique ; les lésions hépatiques ont une consistance rappelant celle du fromage de Roquefort.

3. Evolution de l'infestation.

En examinant de nombreux animaux infestés, nous avons pu suivre approximativement les progrès de l'infestation.

Les parasites se multiplient d'abord à la surface des feuilletés péritonéaux au niveau desquels ils provoquent une irritation non congestive avec production possible d'une ascite dont nous étudierons plus loin la composante cellulaire.

Le premier organe atteint est, en général, le pancréas (photo 1) : on y observe un ou plusieurs abcès de taille variable ; cette localisation peut d'ailleurs rester unique ; généralement, l'envahissement se poursuit par le foie (photo 2) bien que le foie soit, assez souvent, le seul organe atteint. La première lésion est située très fréquemment dans la région avoisinant le point d'émergence des veines sus-hépatiques et envahit le pôle lobaire en contact avec la coupole diaphragmatique ; les autres lobes peuvent également être intéressés, en particulier ceux de la partie gauche.

A noter que nous n'avons jusqu'ici observé aucune localisation splénique chez les animaux que nous avons étudiés.

B - Examen microscopique

Des points de vue cytologique et histologique, nous rapportons ici les constatations que nous avons faites au niveau de l'ascite et des lésions hépatiques.

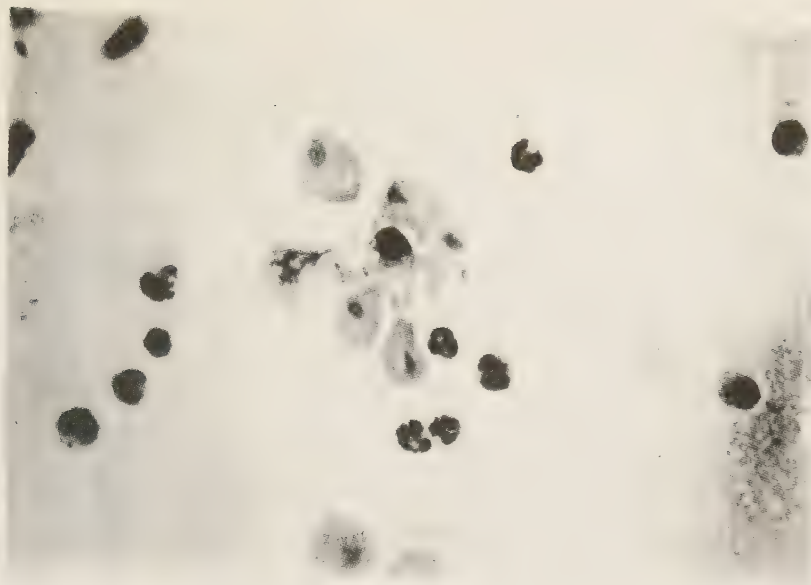


PHOTO 3 - x 400 - Ascite chez une souris infestée: trophozoïte de Trichomonas vaginalis.

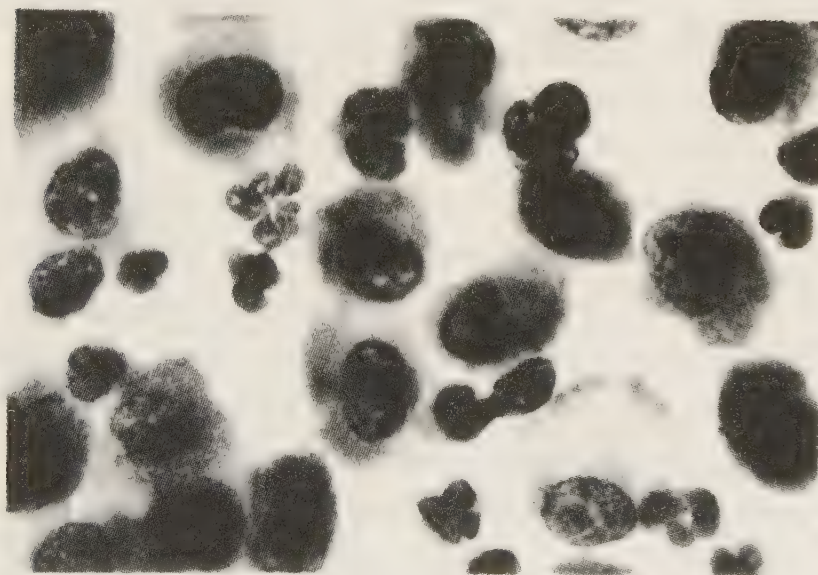


PHOTO 4 - x 1000 - Frottis très riche, formé surtout de cellules mésothéliales "irritées", à protoplasme basophile, auxquelles s'ajoutent quelques granulocytes (polynucléaires) à noyau parfois hypersegmenté.

1. L'ascite.

On peut d'abord y observer des flagellés vivants et mobiles (photo 3), isolés ou plus ou moins agglutinés, parfois en division. Ces flagellés peuvent aussi être immobiles, arrondis ou en voie de dégénérescence granuleuse.

Sur le plan cellulaire, nous avons pu faire les observations suivantes après coloration au May Grunwald-Giemsa.

- a - Animaux non préparés et inoculés avec la Souche
S₁₂. pathogène - (photos 4 et 5).

Nombreux éléments nucléés constitués presque uniquement par des cellules mésothéliales "irritées" isolées ou en placards. La taille est variable (25 à 50 microns), les éléments les plus petits ayant un protoplasme hyperbasophile ; cette basophilie s'atténue dans les cellules plus grandes, dont les contours sont irréguliers et incertains et qui présentent les aspects cytologiques d'une activité macrophagique, sous la forme d'inclusions azurophiles ou de vacuoles incolores.

Ces observations faites in vivo sont à rapprocher de celles que rapportent MICHEL, WESTPHAL, GARCIA et KORNMÜLLER (72) selon lesquelles les macrophages obtenus à partir de Souris préalablement sensibilisées par Trichomonas vaginalis, ont tendance à s'agglomérer in vitro autour des flagellés de la souche homologue.

On trouve, par ailleurs, des signes d'une multiplication intense par la présence d'éléments à 2, 3, voire 4 noyaux, atteignant 70 à 80 microns. Cet ensemble est complété par la présence de quelques histiocytes macrophages, de granulocytes (poly-

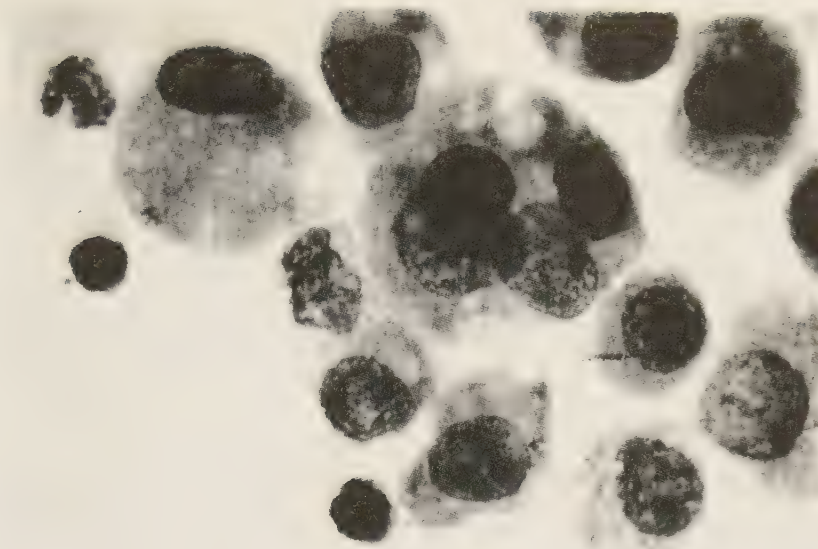


PHOTO 5 - x 1000 - Nombreuses cellules mésothéliales: protoplasme basophile souvent microvacuolaire, renfermant parfois des restes de macrophagie; noyaux arrondis ou ovalaires, parfois discrètement réniformes, presque toujours excentrés; volumineux élément quadrinucléé. Deux petits lymphocytes pycnotiques et un noyau de polynucléaire.



PHOTO 6 - x 1000 - Trois polynucléaires en voie de dégénérescence; à droite du centre, occupé par une ombre de Gumprecht, cellule de type histiocyttaire, à noyau excentré, réniforme, irrégulier et vacuolaire, bordé par un protoplasme rempli de vacuoles rondes; à droite de cet élément, restes d'une cellule mésothéliales.

nucléaires) neutrophiles à noyau hypersegmenté et présentant des signes de dégénérescence, enfin de rares lymphocytes.

- b - Animaux traités au préalable par des hématies
.....
d'embryon de Poulet puis inoculés avec la Souche S₁₂ normale -
.....
(photos 6 et 7).

Les cellules mésothéliales sont beaucoup moins abondantes et présentent toutes l'aspect macrophagique ; nombre d'entre elles sont en voie de lyse et ne montrent que les restes d'un noyau de taille réduite formé de quelques filaments chromatiniens hypochromiques dans un cytoplasme étendu. Les polynucléaires nombreux sont en voie de dégénérescence. On trouve, assez souvent, des ombres nucléaires de Grumprecht.

- c - Animaux traités préalablement par des hématies
.....
d'embryon de Poulet puis inoculés avec la Souche S₁₂ pathogène -
.....
(photos 8 et 9).

La plupart des cellules sont en voie de lyse avancée et pratiquement méconnaissables. La forme de certains restes de noyaux permet cependant de penser qu'il s'agit de cellules mésothéliales et polynucléaires.

2. Lésions hépatiques

Le parenchyme hépatique (photo 10) présente de vastes plages de nécrose qui semblent se développer à partir des espaces portes lesquels, par ailleurs, conservent un aspect sensiblement normal. Le noyau des hépatocytes est pycnotique et leur cytoplasme est hyperéosinophile.

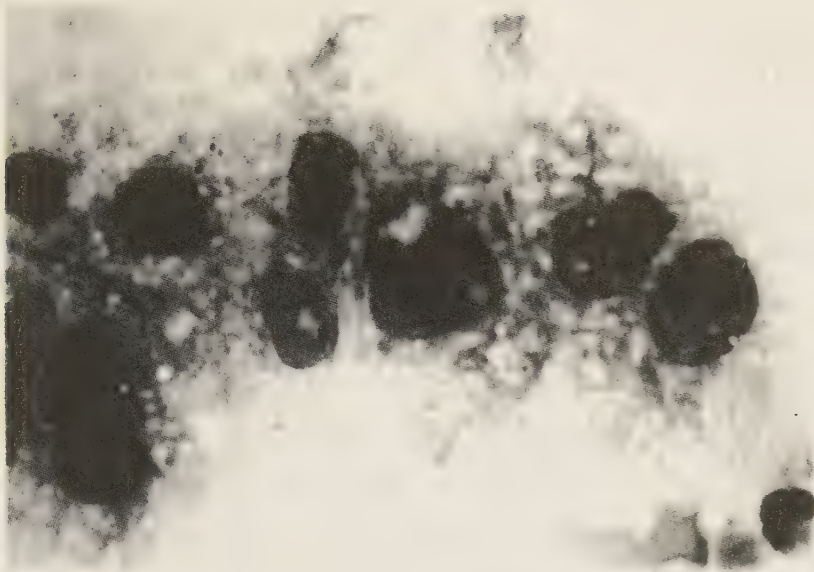


PHOTO 7 -x 1000 - Placard d'éléments mésothéliaux aux limites imprécises; protoplasme basophile parsemé de vacuoles de taille variable.

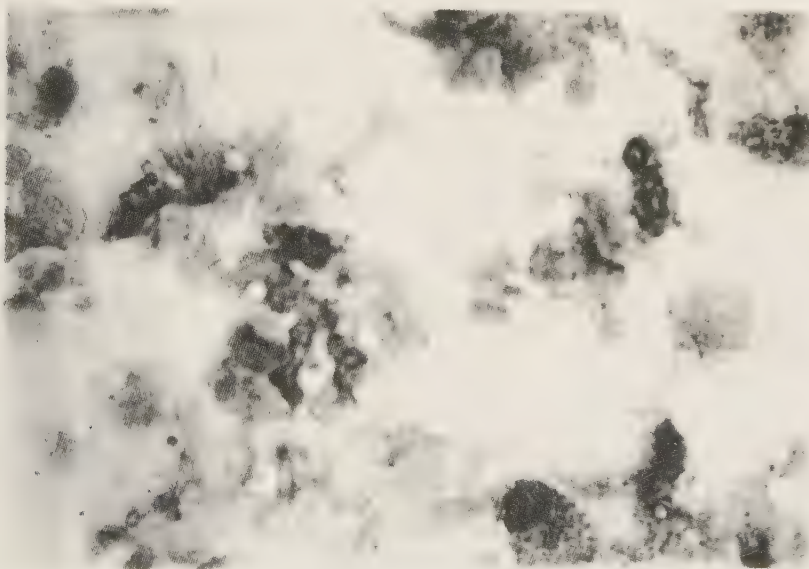


PHOTO 8 -x 1000- Nombreux restes de cellules lysées, pratiquement méconnaissables. Les vestiges nucléaires arrondis correspondraient peut être à des éléments mésothéliaux et ceux de forme irrégulière à des polynucléaires.

La limite entre le foyer nécrosé et le parenchyme environnant est bien marquée. Au niveau des lésions, on observe un exsudat fibrinoïde important, accompagné d'une infiltration inflammatoire, sans vasodilatation, avec polynucléaires et cellules macrophagiques.

Au sein des foyers, il est possible d'observer des flagellés. On y trouve aussi mais rarement quelques granules de pigments biliaires dont la présence traduit une certaine stase locale. A ce propos, il nous faut signaler que l'on peut remarquer la présence de cristaux de cholestérol dans bon nombre de lésions examinées entre lame et lamelle.

L'examen de la surface périphérique des lésions nous a permis l'observation d'images assez curieuses (photos 11 et 12) ; on observe, à la périphérie, la réaction mésothéliale dont il a été question plus haut : de plus, on peut voir, alignés le long de la surface, de nombreux éléments cellulaires dont l'organisation est difficile à étudier mais qui sont certainement des flagellés. A certains endroits, on peut observer un aspect différent avec présence, au-dessus des hépatocytes altérés, d'une sorte de couenne comportant des cellules mésothéliales et des flagellés.

III. Discussion

Les lésions pancréatiques ou hépatiques peuvent présenter, sous la pince, des consistances différentes.

Lorsqu'elles sont souples et friables, l'observateur a toutes chances de trouver des trophozoïtes mobiles sous le microscope.

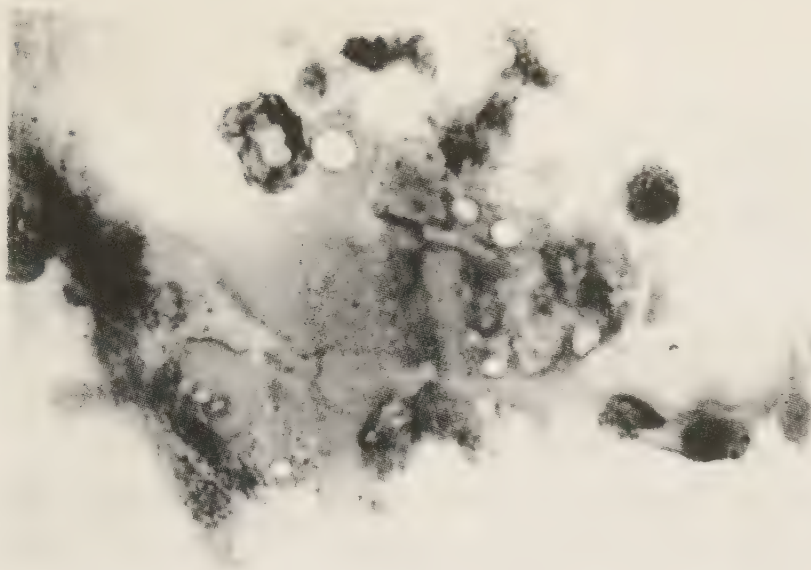


PHOTO 9 -x 1000 - A l'exception d'un polynucléaire et de deux lymphocytes, le champ est occupé par une masse homogène, correspondant aux vestiges d'une cytolysé.

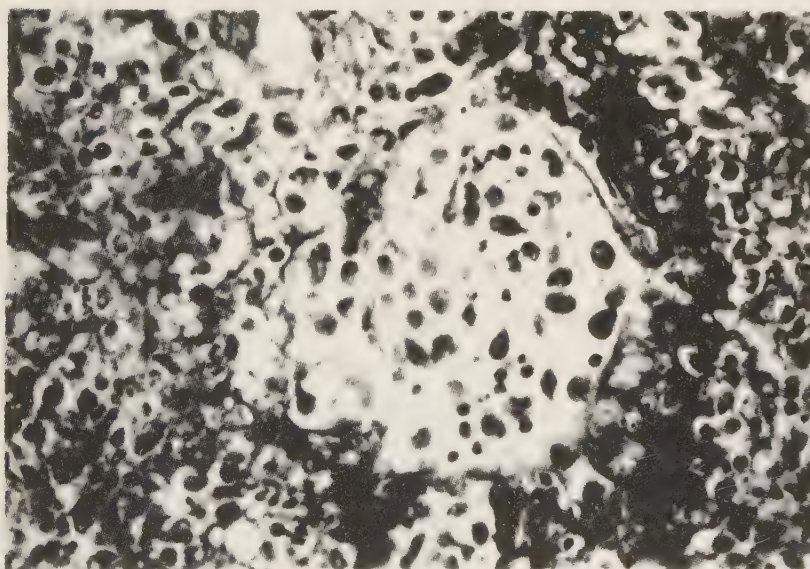


PHOTO 10 -x 400 - Au sein d'une zone nécrotique, on remarque l'exsudat fibrinoïde, l'infiltration inflammatoire et des flagellés.

En revanche, lorsqu'elles sont recouvertes d'une "membrane" résistante qu'il faut trouser pour en extraire le pus à examiner, les chances de trouver des trophozoïtes mobiles se réduisent beaucoup. A l'examen de ces lésions, on remarque de grandes formes rondes et immobiles qui pourraient être des flagellés ayant pris cette forme sous l'influence de circonstances défavorables.

Après examen des ascites et quelles que soient les conditions de l'infestation, nous sommes en présence d'une importante réaction d'irritation du mésothélium péritonéal sans tendance à la malignité.

Nous avons hésité un moment sur la voie de pénétration des flagellés au sein du parenchyme hépatique : celle-ci se fait-elle directement par l'extérieur, donc par progression centripète ou passe-t-elle par le hile à partir duquel les flagellés, suivant les espaces périlobulaires envahiraient les lobules de façon centrifuge ?

Nous inclinons maintenant pour la première hypothèse à l'examen des lames montrant les flagellés en "palissade" (photo 12) à la périphérie de l'organe. Ceci a été confirmé lors de l'étude histochimique (chap. IV) mais il semble aussi que les flagellés puissent emprunter, à partir de la périphérie, des voies périlobulaires qui offriraient à l'invasion du flagellé des voies de moindre résistance.

IV. Conclusion

- L'examen microscopique indique que l'infestation se développe en provoquant principalement :

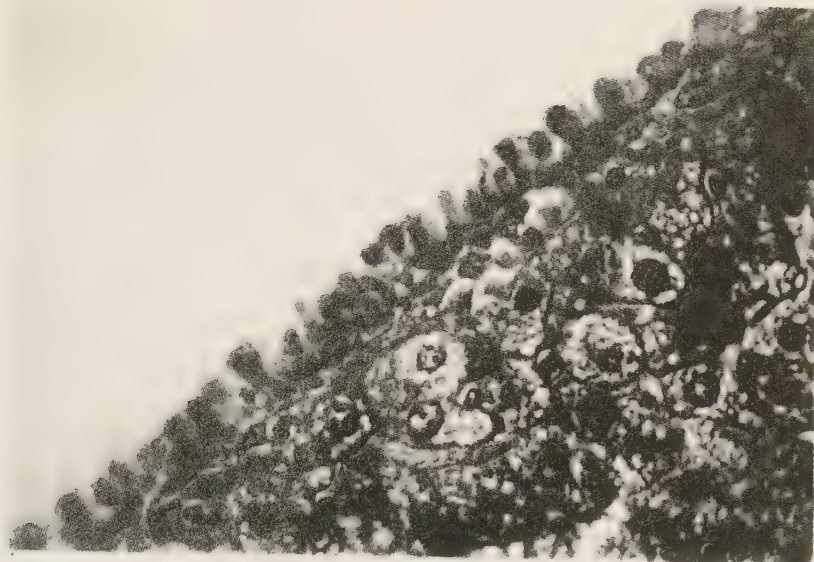


PHOTO II - x 400 - Flagellés disposés en "palissade".

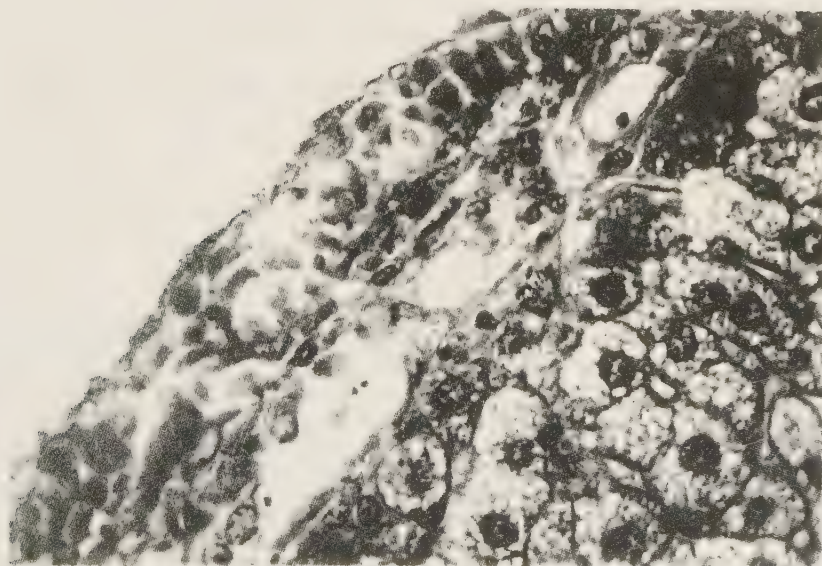


PHOTO II et I2 -x 400 - Aspects de la réaction inflammatoire à la surface du foie; certains des éléments cellulaires sont vraisemblablement des flagellés (noter l'aspect vacuolaire des hépatocytes sous - jacents).

une nécrose hépatique à un ou plusieurs foyers ;
un ou des abcès pancréatiques ;
des abcès péritonéaux ;
un liquide d'ascite.

Les trois premiers éléments de l'infestation sont indépendants les uns des autres. L'ascite, lorsqu'elle est présente, est toujours un élément d'accompagnement.

- A l'examen microscopique, on semble reconnaître une sorte de hiérarchie des dégâts observables au niveau des cellules présentes dans l'ascite : les plus importants correspondant à l'utilisation conjuguée des H.E.P. et de la souche pathogène.

Comme le confirmera l'étude histochimique, on constate, dans les lésions hépatiques, un exsudat fibrinoïde important accompagné d'une infiltration inflammatoire sans vasodilatation avec polynucléaires et cellules macrophagiques ; on y observe aussi des flagellés plus ou moins abondants.

- L'évolution de l'infestation semble se faire à partir de la périphérie des organes.

CHAPITRE IV

Etude histochimique des lésions parasitées

Notre étude histochimique a pour but de préciser les effets qu'exerce Trichomonas vaginalis dans les organes qu'il parasite, en particulier foie et pancréas, au niveau de leurs constituants glucidiques, protidiques et lipidiques à l'aide de techniques dont la valeur et la précision ont été reconnues par l'usage ou que nous ont recommandé des spécialistes, parmi les plus récentes.

I. Matériel et méthodes

A - Etude des glucides

L'ensemble des substances de nature glucidique est caractérisé grâce à la réaction dite P.A.S. (acide périodique - Schiff). Parmi les divers constituants, on distingue les glucides complexes, acides ou neutres, grâce à la propriété métachromatique.

1. Réaction P.A.S.

a - Principe

Elle a pour but de révéler les groupements α -glycol ou vic-glycol -CHOH-CHOH- capables de subir l'oxydation avec rupture de la liaison qui les unit ; il se forme ainsi 2 molécules d'aldéhyde.



ce sont les groupements -CHO ainsi formés qui vont fournir, avec le réactif de Schiff, la coloration rouge typique d'une réaction positive.

La réaction P.A.S. comporte 2 temps successifs, l'oxydation et la coloration.

- L'oxydation est assurée par l'acide périodique ; elle est sélective à température ordinaire si on ne dépasse pas 10 à 15 minutes de contact entre le réactif et le matériel traité. Au delà, des phénomènes de suroxydation, non spécifiques, peuvent apparaître.

- Coloration

La Fuchsine basique, décolorée par l'anhydride sulfureux est colorée par la présence d'aldéhyde. L'interprétation doit tenir compte de la présence de substances aldéhydiques qui peuvent préexister et aussi de la possibilité d'une coloration spontanée du réactif de Schiff décoloré.

Ces risques de réactions faussement positives sont écartés en faisant agir le réactif de Schiff sur une préparation non traitée par l'acide périodique ; celle-ci devra rester incolore ou légèrement jaunâtre.

D'autre part, afin d'éviter toute erreur de localisation due à une coloration du réactif de Schiff au contact de l'air ou de l'eau, on devra utiliser de l'eau sulfureuse comme liquide de rinçage ou de décoloration. Dans ces conditions, seul subsistera le réactif déjà fixé sur les groupements α -glycols ; une immersion de quelques minutes dans l'eau ordinaire à $\text{pH} \geq 7$ suffira à faire apparaître la coloration.

Ainsi menée, la réaction possède une spécificité très satisfaisante mais non absolue. En particulier, la présence de radicaux $-\text{NH}_2$ et $-\text{NH}-$ peut engendrer de fausses colorations ; celles-ci peuvent être localisées en effectuant parallèlement un essai sans oxydation, une recherche de la métachromasie et des réactions caractéristiques de la fonction amine.

En confrontant les résultats ainsi obtenus, il est possible, par recoupements, de conférer une spécificité quasi-totale à la réaction P.A.S. dans la détection des substances glucidiques. On utilise, pour terminer la coloration du matériel, l'hématoxyline de GROAT pour les noyaux et l'orangé G pour le cytoplasme.

- La fixation qui précède ces opérations permet de caractériser les glucides simples en particulier le glycogène, et les mucopolysaccharides. Le glycogène, particulièrement difficile à fixer, exige l'intervention d'une forte concentration en acide picrique et un traitement à 0°C . Le mode opératoire est valable pour le glycogène et les mucopolysaccharides.

- Le glycogène est le seul glucide simple, rencontré dans les tissus avec éventuellement le galactogène. Menée à l'aide de la réaction P.A.S. la détection doit comporter 2 préparations traitées parallèlement, l'une directement, l'autre servant de contrôle, après action de l' α amylase salivaire qui dépolymérise spécifiquement le glycogène et fait donc disparaître la coloration.

La comparaison des 2 préparations permet aussi une localisation très précise du polysaccharide. On peut éventuellement adjoindre une troisième préparation qui est traitée par l'eau distillée et permet de conclure à une action enzymatique spécifique de la part de l' α amylase et non à une hydrolyse banale.

b - Technique

* Fixation - [LISON (63)] .

Réactif de Rossman :	Alcool absolu saturé en acide	90 p. cent.
	picrique	
	Formol neutre (à 10 p. cent)	10 p. cent.

On fixe 24 heures à 0°C.

On inclut dans la paraffine.

* Réaction P.A.S. [MAC MANUS (65), HOTCHKISS (43)] .

- 1 Déparaffiner, collodionner, hydrater.
- 2 Oxyder 10 min. à température ordinaire dans de l'acide périodique à 0,5 %.
- 3 Laver à l'eau distillée.
- 4 Traiter par le réactif de Schiff 10-15 min. à température ordinaire.
- 5 Rincer dans 3 bains à l'eau sulfureuse.
- 6 Laver 10 min. à l'eau courante.
- 7 Traiter 5 min. dans l'hématoxyline de Groat.
- 8 Passer 10 min. à l'eau courante.
- 9 Rincer à l'eau distillée.
- 10 Colorer 5 min. par le mélange Cleveland.
- 11 Rincer à l'eau distillée.
- 12 Deshydrater dans de l'alcool absolu.
- 13 Monter dans du X.A.M.

γ Réaction P.A.S. - Test à la salive [LISON (63)]

- 1 Préparations déparaffinées non collodionnées hydratées.
 - 2 Traiter 1 h à 37°, en boîte de Petri couverte, par de la salive.
 - 3 Rincer à l'eau distillée.
 - 4 Effectuer la réaction P.A.S.
- Les lames sont faites en double. Une des lames est incubée à 37° avec de l'eau distillée à la place de la salive.
 - Procéder ensuite comme précédemment.

* Réaction P.A.S. - Test sans oxydation. [LISON (63)]

- Procéder comme pour la réaction P.A.S. en omettant les opérations 2 et 3.

2. Métachromasie

a - Principe

Selon EHRLICH, certaines teintures colorent certains éléments histologiques avec une nuance différente de la solution colorante ; c'est la définition de la métachromasie.

Cette propriété de faire virer le colorant appartient aux mucopolysaccharides acides et à eux seuls parmi les glucides.

Cette propriété se manifeste d'ailleurs à des pH différents selon la nature des radicaux acides :

- pH au plus égal à 3 pour les mucopolysaccharides acides possédant des groupements $-SO_3H$;
- pH compris entre 4 et 5 pour ceux qui possèdent des radicaux $-COOH$

Il faut signaler que ces mucopolysaccharides acides sont peu ou pas sensibles à la réaction au P.A.S. à l'inverse des mucopolysaccharides neutres qui répondent positivement à cette réaction en donnant cependant une teinte rose différente de celle fournie par le glycogène.

b - Technique [LISON (63)] .

1 Déparaaffiner, hydrater.

2 Colorer 60 min. à température ordinaire dans le bleu de toluidine à 0,1 p. cent dans le tampon Walpole, d'une part, à différents pH dans l'eau distillée, d'autre part.

Formule du tampon : Acide acétique/Acétate de Na à pH 2,99

4,05

4,99.

3 Rincer 10 secondes dans le tampon en agitant.

4 Essorer au papier Joseph.

5 Immerger dans l'alcool absolu.

6 Passer dans un bain de toluène.

7 Monter dans le X.A.M. les 4 lames.

B - Etude des protides

La détection histochimique des protides ne met pas en jeu les liaisons peptidiques mais utilise la réactivité de certains radicaux propres aux acides aminés constitutifs. Parmi ces radicaux les plus importants sont :

- Le radical amine primaire - NH_2 ;
- Les radicaux cycliques, phénols, indols ;
- Les radicaux sulfhydrile -SH ou disulfure -S-S- .

Pour chacune de ces catégories on met en oeuvre 2 réactions différentes dont les résultats, par leur concordance, permettent des conclusions à l'abri d'erreurs dues à de fausses réactions.

1. Détection du radical amine primaire = NH₂.

Nous avons utilisé :

- la méthode à la ninhydrine - Schiff.
- la réaction à l'azométhine

a - Méthode à la ninhydrine-Schiff.

* Principe

Il est fondé sur la mise en jeu d'une désamination oxydative, génératrice d'un aldéhyde dont l'apparition sera mise en évidence par le réactif de Schiff.

La réaction peut s'écrire schématiquement comme suit :



visualisé par le Réactif de Schiff.

Pour la produire on utilise la ninhydrine, peu agressive pour les coupes histologiques et fournissant les teintes les plus vives. Certaines techniques se servent de l'alloxane, de la chloramine T, de l'hypochlorite de sodium ... L'utilisation de la réaction de Schiff exige les mêmes précautions que nous avons décrites plus haut.

Dans ces conditions, la spécificité de la méthode est satisfaisante. Cependant, des réponses faussement positives peuvent provenir des -NH₂ appartenant à des lipides complexes.

β Technique [YASUMA, ICHIKAWA (120)] .

Fixation au Carnoy.

..... Chloroforme	5 ml
..... Acide acétique glacial	10 ml
..... Alcool absolu	85 ml

Inclusion à la paraffine. Coupe à 5 μ.

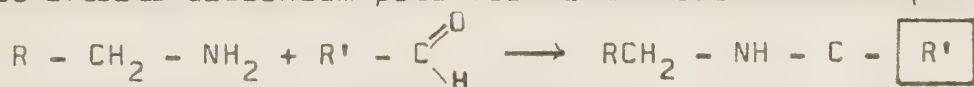
- 1 Déparaaffiner, hydrater.
- 2 Traiter 20 h. à 37°C dans la ninhydrine à 0,1% dans l'alcool absolu.
- 3 Rincer à l'eau courante.
- 4 Plonger 15 à 25 min. dans le réactif de Schiff.
- 5 Rincer à l'eau sulfureuse.
- 6 Déshydrater dans l'alcool absolu.
- 7 Monter dans le X.A.M.

Lames faites en double. 1 témoin est incubé 20 h. à 37°C dans l'alcool absolu sans ninhydrine ; contrôle du Schiff.

b - Réaction à l'azométhine

* Principe

Cette réaction est fondée sur la formation d'un complexe dit azométhine obtenu par réaction du $-NH_2$ avec un aldéhyde. Cet aldéhyde devra comporter un radical susceptible de se combiner avec un sel de diazonium pour former un colorant azoïque.



R' devant se prêter, par sa structure, à la copulation diazoïque.

En pratique, on utilise :

comme réactif aldéhydique, l'hydroxy-2-naphtaldéhyde 3, substance instable.

comme sel de diazonium, le Fast Blue B.

La spécificité d'une telle réaction est bonne, en particulier semble-t-il pour les groupements $-NH_2$ des protéines. On s'en sert habituellement comme contrôle de la méthode à la ninhydrine-Schiff.

* Technique [WEISS, TSOU, SELIGMAN (114)] .

Fixation au Carnoy. Inclusion à la paraffine. Coupe à 5 μ .

1 Déparaffiner, rincer à l'alcool à 95°.

2 Traiter 1 h. à 0°C ordinaire par le réactif :

[2-Hydroxy 3-naphtaldéhyde	20 mg.
Acétone	20 ml.
Tampon véronal 0,1 M pH 8,5	30 ml.

3 Laver 3 fois 5 min. à l'eau distillée.

4 Copuler 3-4 min. dans le mélange extemporané :

[Fast Blue B salt	25 mg.
Tampon véronal 0,1 M pH 7,4	50 ml.

5 Rincer 5 min. à l'eau courante.

6 Déhydrater dans l'alcool absolu.

7 Monter dans le X.A.M.

Toutes les lames sont faites en double. L'une sert de témoin dans un milieu sans réactif pour contrôler le Fast Blue B.

2. Détection des amino-acides à radicaux cycliques.

Il s'agit de la tyrosine porteuse d'une fonction phénol, de la proline qui comporte un noyau pyrrole, de l'histidine à noyau imidazole.

On dispose :

- d'une réaction générale des noyaux cycliques, la diazoréaction ;
- d'une réaction caractéristique du radical -OH phénollique dite Réaction de Millon ;

- d'une réaction spécifique des radicaux indoliques ou pyrroliques de Glenner.

a - La diazoréaction
.....

* Principe

Dans la diazoréaction, un sel de diazonium réagit avec un noyau cyclique en donnant un complexe azoïque coloré. Ce complexe peut être lui-même couplé avec un autre sel de diazonium afin d'obtenir une teinte plus profonde. On en vient ainsi à utiliser un sel de tétrazonium.

Ainsi menée, la diazoréaction convient à la détection de la plupart des noyaux cycliques. Elle donne également des résultats positifs avec les amines primaires et l'histidine.

* Technique [DANIELLI (19)] .

Fixation au réactif de Rossmann. Inclusion dans la paraffine.

- 1 Déparaffiner, hydrater.
- 2 Immerger 5 min. dans une solution extemporanée de Fast blue B à 0,2 % dans un tampon au véronal à pH 9,2.
- 3 Laver à l'eau distillée.
- 4 Rincer 3 fois quelques instants avec le tampon à pH 9,2.
- 5 Copuler 15 min. dans une solution saturée d'acide 8 amino - 1 naphthol - 3,6 disulfonique (acide S) dans le tampon à pH 9,2.
- 6 Laver quelques minutes à l'eau distillée.
- 7 Déshydrater, monter au X.A.M.

Trois coupes	:	- 1 traitement complet.
	:	- 1 au Fast blue B seul.
	:	- 1 à l'acide S seul.

b - Réaction de Millon
.....

* Principe

En présence d'un sel nitreux, l'ion mercurique donne, avec une fonction phénol, un complexe mercurique d'un nitroso-phénol coloré en marron orangé assez pâle.

Sont aussi caractérisés tous les monophénols et les diphénols en para. A noter que le tryptophane se révèle dans ces conditions en lumière ultra-violette.

* Technique [MIRSKY, POLLISTER, RIS (75)] .

Fixation au Carnoy. Inclusion dans la paraffine.

1 Déparaffiner, hydrater.

2 Essorer au papier Joseph.

3 Traiter, 5 min. à 30°C en boîte de Pétri couverte, par le réactif de Millon trichloracétique.

[Acide trichloracétique 60 % à 4°C dans	5 ml.
Eau distillée	5 ml.
Acétate mercurique	0,5 g.

4 Ajouter dans le milieu environ 1 ml de nitrite de sodium à 1 % pour 20 cc de réactif. Mettre à l'étuve à 37°C 25 min.

5 Essorer au papier Joseph.

6 Laver trois fois 5 min. dans l'alcool à 70°.

7 Déhydrater. Monter dans le X.A.M.

c - Réaction de Glenner
.....

* Principe

La réaction de Glenner utilise le couplage de la p. aminobenzaldéhyde en α ou en p avec un radical indole ou pyrrole, le noyau se tautomérise alors en indolénine ou en pyrrolénine et

forme un complexe coloré en violet. La proline et le tryptophane sont les amino-acides qui fournissent une réaction de Glenner positive. D'autres composés cycliques donnent des complexes colorés en jaune brun ou rouge.

* Technique [GLENNER (27)] .

Fixation au Carnoy. Inclusion dans la paraffine.

- 1 Déparaffiner. Amener à l'alcool absolu.
- 2 Sécher 30 sec. les lames à l'air.
- 3 Traiter 3 min. dans le réactif.

p.D.A.B.	1 g.
Acide perchlorique	60 ml.
Acide acétique	30 ml.
HCl pur	1 ml.

- 4 Transférer directement dans la solution extemporannée.

Nitrite de sodium	0,5 g.
Acide acétique	35 ml.
HCl pur	5 ml.

- 5 Laver dans 3 bains d'acide acétique pur.
- 6 Passer 3 fois dans le toluène pur.
- 7 Monter au X.A.M.

3. Détection des protéines à radicaux Soufrés.

Il s'agit en fait de la détection des acides aminés soufrés cystéine et cystine pour laquelle on utilise 2 réactions complémentaires.

- la réaction au disulfure de dihydroxy-2-2' dinaphtyl 6-6' (D.D.D.).
- la réaction au tétrazolium.

a - La réaction au D.D.D.

* Principe

Il repose sur l'estérification du groupement thiol-SH par les OH du D.D.D., ce qui a pour effet de créer des liaisons -S-S-. Le radical naphthyl du réactif est ensuite couplé avec un sel de diazonium ce qui fait apparaître une coloration qui peut varier du rouge au bleu suivant le nombre de radicaux -SH. La spécificité est rigoureusement attachée à la présence de -SH.

* Technique [BARNETT, SELIGMAN (9)] .

Fixation au Carnoy. Inclusion paraffine (Coupes non collées à l'albumine).).

- 1 Déparaffiner. Amener à l'alcool à 95°.
- 2 Incuber 1 h à 50°C dans la solution.

[Disulfure de 2-2' dihydroxy.6-6' dinaphtyle	25 ml.
Alcool absolu	15 ml.
Tampon véronal à pH 8,5	35 ml.

- 3 Retirer du bain-marie et laisser revenir à la température ordinaire.
- 4 Rincer à l'eau distillée.
- 5 Laver 2 fois 5 min. dans l'eau distillée acidifiée par l'acide acétique pH 4-4,5.
- 6 Déshydrater jusqu'à l'alcool absolu.
- 7 Rincer 2 fois à l'alcool absolu pendant 5 min.
- 8 Copuler 2 Min. dans la solution extemporanée suivante :

[Fast Blue B salt	50 mg.
Tampon phosphates 0,1 M à pH 7,4	50 ml.

- 9 Rincer à l'eau distillée.
- 10 Déshydrater jusqu'à l'alcool absolu. Monter au X.A.M.

b - Réaction au tétrazolium.
.....

* Principe

Il est fondé sur la réduction d'un sel de tétrazolium par les radicaux -SH. Ces radicaux, dans les conditions de la réaction, sont à la fois préexistants et artificiellement créés à partir des -S-S- par les sels du tampon employé qui élèvent le pH à 12,8 ; on caractérise en bloc -SH et -S-S-, d'où l'intensité plus vive des teintes obtenues.

Cette réaction n'est spécifique de ces radicaux qu'au pH employé.

* Technique [BARNETT, SELIGMAN (8)] .

Fixation au Carnoy. Inclusion paraffine. Coupes non collées.

1 Déparaffiner. Hydrater.

2 Traiter 1 h à 60°C dans le réactif :

[Néotétrazolium	0,01 g.
[Tampon glycocolle - NaOH-NaCl pH 12,8	40 ml.

3 Laver à l'eau courante.

4 Monter en milieu aqueux (Water mounting medium).

C - Etude des lipides

1. Principe

Les histochimistes distinguent 2 groupes de substances lipidiques :

- les lipides simples qui ne résistent pas aux épreuves de fixation et d'inclusion. Ce sont essentiellement des triglycérides.
- les lipides complexes qui résistent à la fixation et à l'inclu-

sion. Ceux-ci sont porteurs de liaisons éthyléniques ou de radicaux non lipidiques.

La fixation se fait avec le bichromate de potassium qui oxyde les liaisons réactives. Ces oxydations créent des ponts intermoléculaires artificiels qui assurent l'insolubilisation de ces lipides.

Elle comporte un premier bain de bichromate et de formol assurant la fixation et un second bain de bichromate pur, dit de post-chromisation et destiné à parachever l'insolubilisation.

L'inclusion doit se faire avec précaution en utilisant des bains intermédiaires de déshydratation pour éviter de rompre les liaisons par des changements brusques de tension superficielle.

2. Technique

a - Fixation [CHOU (17)] .

1^{er} bain : Fixateur de Ciaccio

- Bichromate de potassium à 3 p. cent 90 ml.
- Formol à 35 p. cent 10 ml.

2^e bain : Postchromisation

- Bichromate 5 p. cent pendant 8 à 9 semaines à température ordinaire.

b - Inclusion dans de la paraffine.

c - Coloration [LISON (63)] .

1 Déparaffiner : amener à l'alcool à 95°.

2 Colorer dans le noir Soudan à saturation dans de l'alcool à 60° + acétone pendant 1 h 30 à 37°C.

3 Différencier dans l'alcool à 50°.

4 Mettre dans l'eau distillée.

5 Monter au "water mounting medium".

D - Infestation des Souris

L'étude histologique que nous rapportons ici concerne des animaux parasités avec la Souche S₁₃ pathogène (après passage chez l'animal).

Nous disposons de 9 souris femelles Swiss Webster âgées de 6 semaines au moment de l'infestation et d'un poids moyen de 20 g.

Celle-ci a été effectuée avec 550.000 flagellés préalablement lavés dans du soluté isotonique de glucose et inoculés au sein de 0,8 ml de soluté isotonique de glucose.

Les animaux sont sacrifiés 25 jours plus tard. Quatre d'entre eux sont parasités ; les cinq autres ne présentent pas d'infestation apparente. Deux animaux sains sont également sacrifiés. On prélève le foie et le pancréas de chaque animal.

II. Résultats

A - Concernant les substances glucidiques

1. Dans le foie

a - Le tissu hépatique sain

apparaît très fourni en glycogène (photo 13) ; les hépatocytes sont colorés en rouge ; leur noyau est bien visible sous la forme d'une plage bien délimitée et non colorée.

Vues à un plus fort grossissement (photo 14), les cellules hépatiques montrent leur contenu glycogénique sous la forme de mottes plus ou moins volumineuses et inégalement réparties dans le cytoplasme.

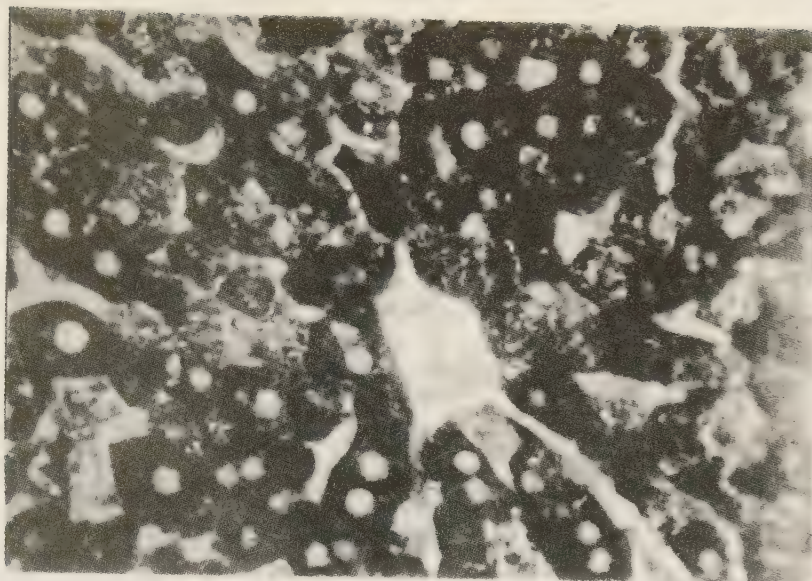


PHOTO 13 -x 320 - Tissu hépatique sain montrant le glycogène dans les hépatocytes.

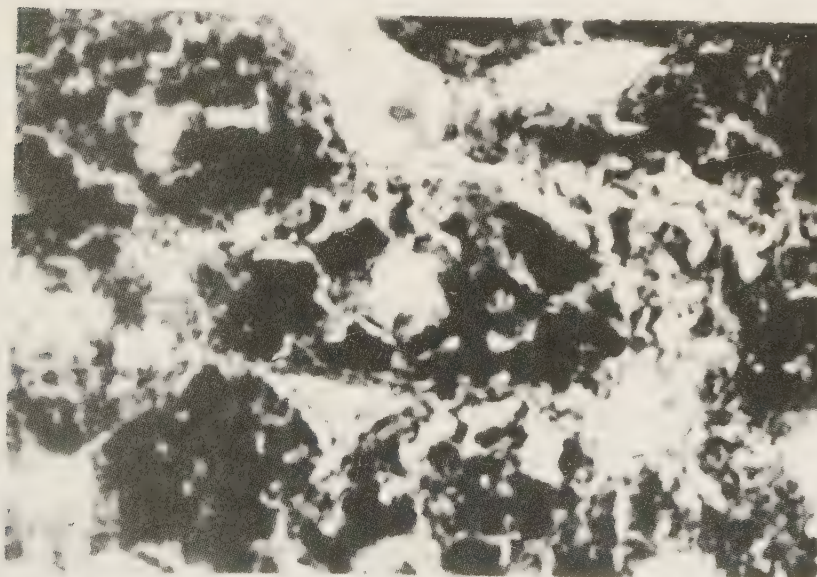


PHOTO 14 - x 1200 - Mottes de glycogène dans quelques hépatocytes.

Soumise à l'épreuve de la salive, une préparation de tissu hépatique sain (photo 15) ne contient plus de glycogène puisque celui-ci a été dépolymérisé par l' α amylase salivaire.

b - Le tissu hépatique parasité
.....

permet d'observer les images microscopiques suivantes :

Les flagellés semblent occuper d'abord la partie périphérique (photo 16) du foie, ce qui confirme les observations histologiques; ils apparaissent sous la forme de petites cellules, fortement P.A.S. positives, réaction qui disparaît après contact avec la salive (photo 17) ce qui identifie au glycogène la réserve glucidique de Trichomonas vaginalis.

En avant des flagellés (photo 16), donc vers l'intérieur du foie, on observe la présence de cellules fibroblastiques et des flaques d'une substance qui a pris une coloration orangée (sans doute sous l'influence de l'orangé G). Enfin, des amas de cellules plus sombres apparaissent comme enclavées au milieu de quelques cellules hépatiques. Plus loin, dans le parenchyme, on rencontre des hépatocytes bien délimités mais dépourvus de glycogène : il s'agit certainement là d'une conséquence de l'infestation de l'organe, remarquable également par le fait qu'elle se produit dans une zone déjà relativement éloignée des formes parasites. L'ensemble de ces observations permet de conclure à l'organisation d'une défense de la part du foie parasité. Celle-ci est le fait des cellules fibroblastiques et de l'infiltration leucocytaire et histocytaire. La substance qui se répand en flaques orangées juste en avant des flagellés est elle aussi un élément de ce tableau sur la nature duquel nous reviendrons plus loin.

D'autres images peuvent également être observées :

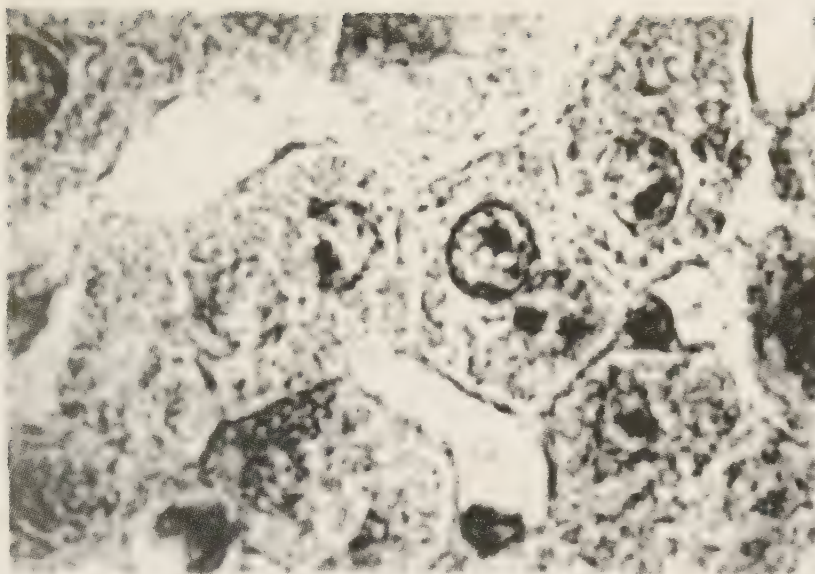


PHOTO 15 - x 1200 - Disparition du glycogène dans quelques hépatocytes après traitement à la salive.

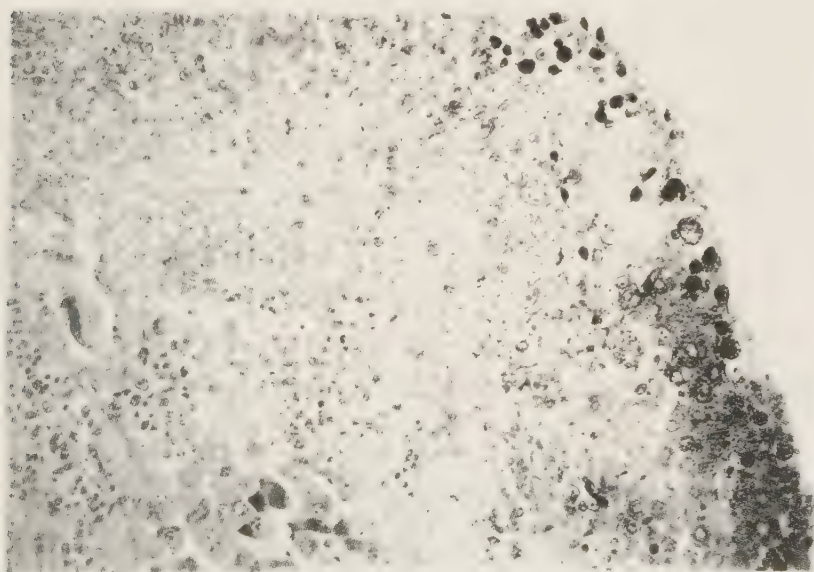


PHOTO 16 - x 120 - On observe de la périphérie vers l'intérieur, des flagellés, puis des cellules fibroblastiques et des flaques de substance orangée, ensuite amas de cellules plus sombres représentant l'infiltration histiocytaire et enfin des hépatocytes bien délimités mais dépourvus de glycogène.

- dans les régions où la présence du flagellé se fait plus discrète, (photo 18) les cellules fibroblastiques sont encore absentes ; seuls quelques amas d'histiocytes sont sur place et surtout, les hépatocytes, même s'ils ne sont pas en contact avec des parasites, sont déjà dépourvus de glycogène.

- Une image très typique correspond à un aspect de "front" ou de "bataille rangée" (photo 19 et photo 20) ; on observe, disposés en couches :

- le tissu hépatique nécrosé, avec présence de larges flaques de substance fibrinoïde de couleur orangée.

- une couche de leucocytes ayant subi la dégénérescence granuleuse.

- quelques files de flagellés, régulièrement alignés et faisant face à :

= une couche de cellules fibroblastiques au milieu de traînées de substance fibrinoïde rose.

= des hépatocytes encore intacts mais privés de leur contenu glycogénique.

Ce n'est que dans les points les plus éloignés de cette zone d'affrontement qu'il est possible d'observer des cellules parfaitement intactes encore pourvues de leur glycogène. Ces 3 dernières zones, parenchyme sain, parenchyme sans glycogène, cellules fibroblastiques sont infiltrées de formes histocytaires qui viennent sans doute participer à la défense de l'organe.

Ces images qui témoignent d'une réaction parfaitement organisée sont à rapprocher, mutatis mutandis, de celles que décrivent FROST et HONIGBERG (23) après infestation par voie sous-cutanée.

La pénétration parasitaire au sein du parenchyme hépa-

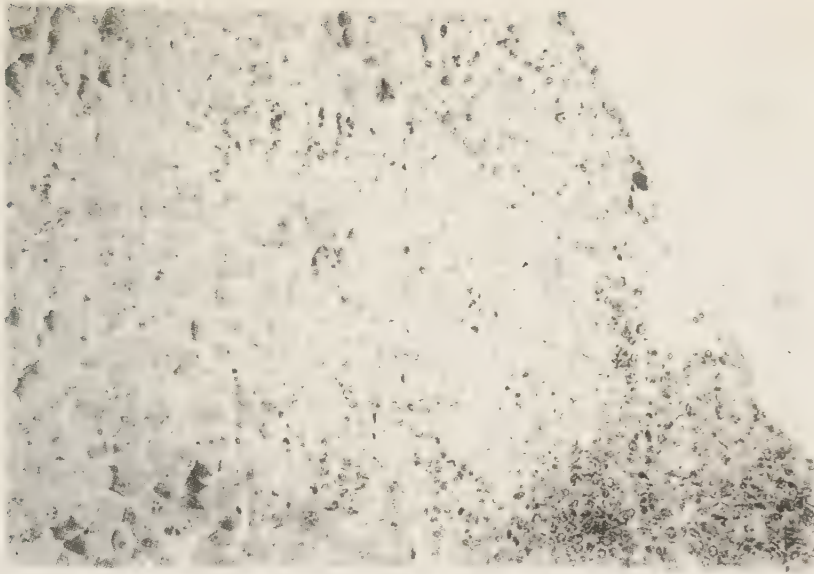


PHOTO 17 -x 120 - Même préparation que la précédente après traitement à la salive. Remarquer la disparition du glycogène dans les flagellés.

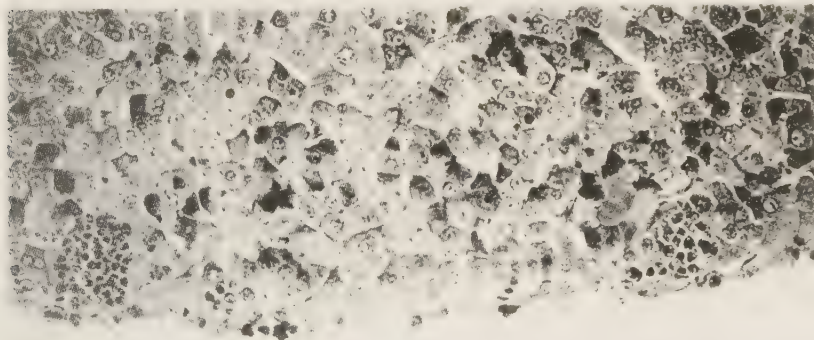


PHOTO 18 -x 120 - Présence discrète des flagellés - Absence de cellules fibroblastiques . Quelques amas d'histiocytes.

tique peut cependant revêtir d'autres aspects ; c'est ainsi que la photo 21 illustre une invasion qui provient toujours de l'extérieur mais semble avoir trouvé rapidement une zone de moindre résistance qui lui a permis de s'infiltrer en coin très en avant dans le tissu. On n'observe qu'une médiocre réaction fibroblastique et les histiocytes sont absents.

Comme il est habituel de le constater, les hépatocytes situés au voisinage de la zone d'invasion ont subi une déplétion glycogénique d'autant plus complète qu'ils sont situés plus près des flagellés.

Il est assez rare d'observer un flagellé inclus dans une cellule. Nous avons cependant pu saisir ce phénomène sur la photographie 22. Elle confirme les observations des auteurs qui ont montré cette présence à l'intérieur de cellules de foie d'embryon de poulet en culture. HONIGBERG et EWALT (38), en effet, décrivent la présence de Trichomonas dans les macrophages et les cellules épithéliales.

En ce qui concerne ce qui précède, toutes les épreuves de contrôle, contact avec la salive, épreuve à l'eau distillée, témoin P.A.S. sans oxydation, établissent que les substances P.A.S. positives sont bien constituées par du glycogène et que la substance fibrinoïde, insensible à l' α amylase salivaire, possède une structure glucidique non glycogénique.

2. Dans le pancréas

a - Le tissu pancréatique exocrine d'un animal sain

montre des acini bien organisés, aux cellules dépourvues de glycogène (photo 23); la teinte uniformément rose pâle de la préparation est due aux glucides constitutifs.

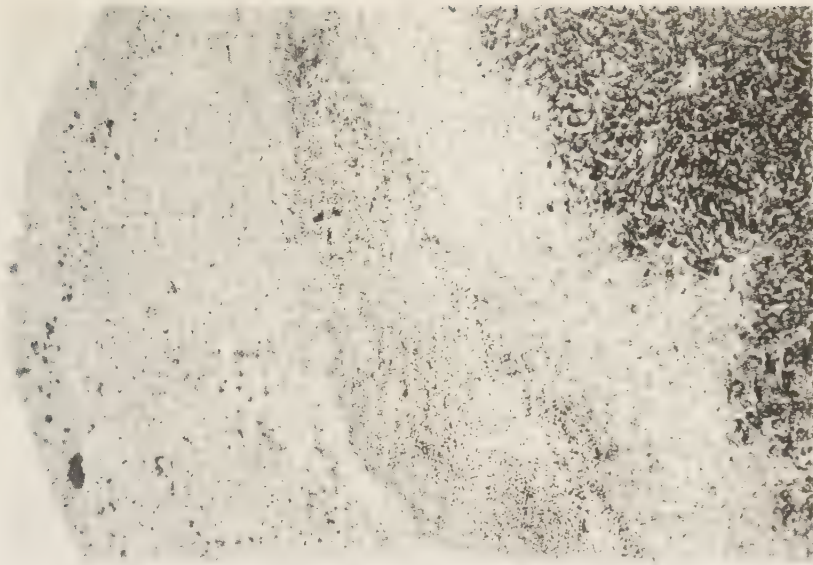


PHOTO 19 - x 50 - Remarquer de la périphérie vers le centre:
- le tissu hépatique nécrosé avec des flaques de substance orangée - la couche de leucocytes ayant subi la dégénérescence granuleuse - les quelques files de flagellés - la couche de cellules fibroblastiques + de la substance fibrinoïde - les hépatocytes dépourvus de glycogène puis les hépatocytes normaux.

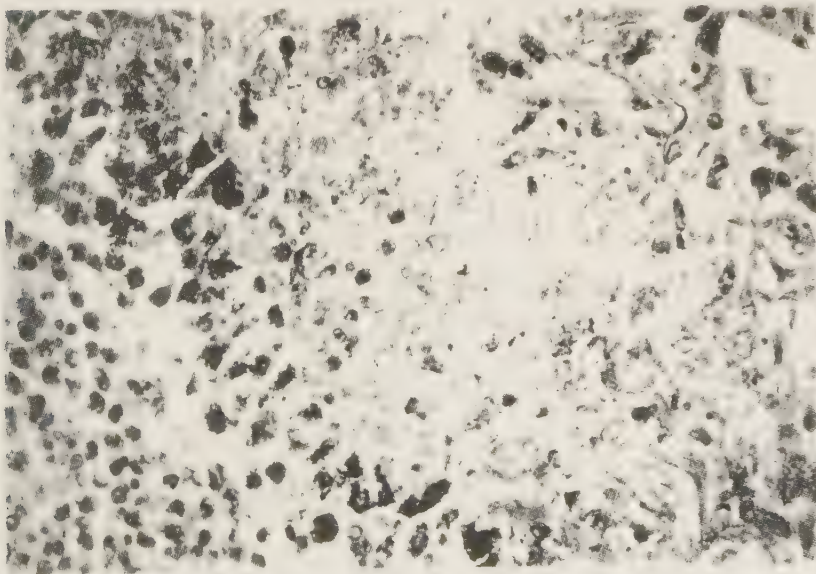


PHOTO 20 -x 320 - Même préparation que la précédente. Observer de gauche à droite, les leucocytes dégénérés, les flagellés, les cellules fibroblastiques avec des macrophages et quelques hépatocytes dépourvus de glycogène.

b - Dans un pancréas parasité
.....

On observe une désorganisation profonde du tissu, sous l'influence d'une infiltration générale par les flagellés (photo 24). Dans les zones moins touchées, on observe un oedème important et partout, la substance fibrinoïde est présente en quantité importante.

Il est à peu près évident que le pancréas est abordé de l'extérieur : à cet égard, les photos 25 et 26, sont particulièrement suggestives. Elles montrent un alignement de flagellés, rangés en palissade, semblables à ceux que nous avons déjà observés et décrits et que FROST et HONIGBERG (23) avaient eux-mêmes retrouvés.

Ce même aspect se retrouve dans la photo 27, mais, cette fois, avec un profil circulaire. Cette image doit correspondre sans doute à la coupe transversale d'un "couloir" de pénétration. On observe, alentour, l'habituelle présence de substance fibrinoïde.

En ce qui concerne les réactions décelant les muc polysaccharides, nous avons noté l'absence de métachromasis sur nos coupes de foie et de pancréas pour les M.P.S. Ag. SO_3H et COOH ; il ne semble donc pas qu'il s'agisse de mucopolysaccharides acides si bien que la substance fibrinoïde présente aussi bien dans le foie que dans le pancréas paraît être constituée de mucopolysaccharides neutres.

B - Concernant les protides

Quelle que soit la réaction utilisée, les images observées montrent la présence de substances protidiques au niveau des zones particulièrement parasitées et infiltrées de substance fi-

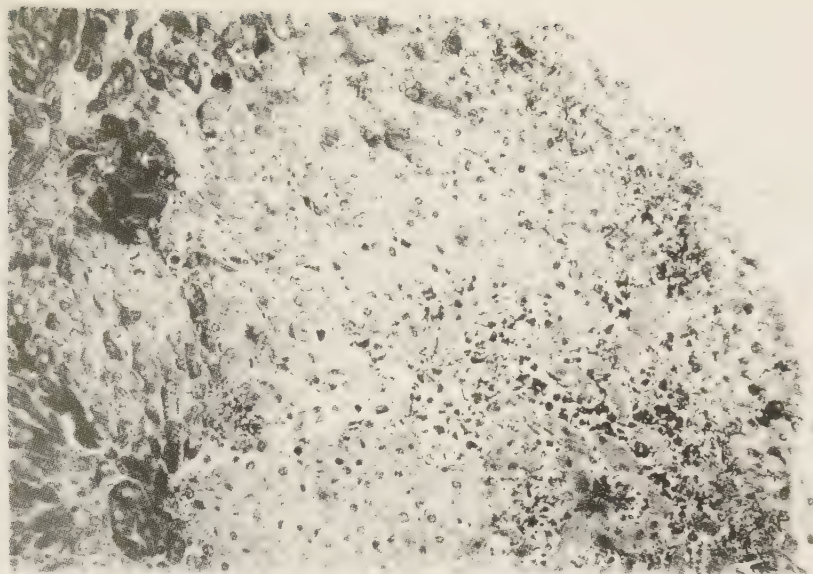


PHOTO 21 -x 120 - Image de pénétration des flagellés en profondeur à partir de la périphérie - Dépletion glycogénique des hépatocytes situés au voisinage de la zone.

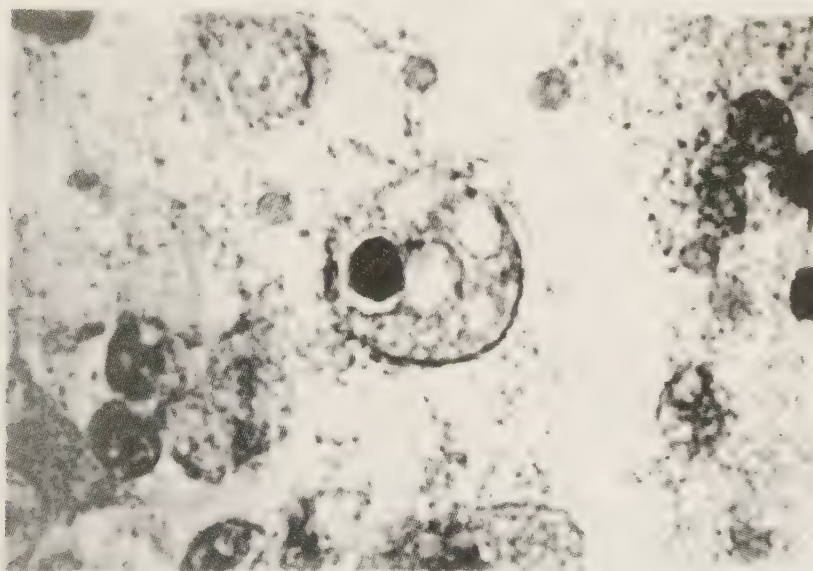


PHOTO 22 - x 1100 - Flagellé inclus dans une cellule.

brincide. La localisation précise des réactions a pu être obtenue en effectuant chaque fois, sur deux coupes identiques, dans un cas la réaction désirée, dans l'autre une réaction P.A.S.

1. Foie.

Le tissu hépatique sain ne fournit que des réactions faibles et uniformes dues aux protides constitutifs. Pour le tissu hépatique parasité, nous avons pu lire les résultats fournis par :

- la réaction à la ninhydrine-Schiff (rad. NH_2).
- la diazoreaction (rad. cycliques).
- la réaction de Glenner (rad. cycliques).
- la réaction au tétrazolium (rad. soufrés).

Dans tous les cas, sur les lames de foie parasité, les réactions s'affirment au niveau des zones très atteintes par le parasitisme et riches en substance fibrinoïde ; tout le reste correspond à une réaction négative fournie par les hépatocytes encore sains, même s'ils sont appauvris en glycogène ; dans ce cas, d'ailleurs, les colorations du fond apparaissent un peu plus soutenues que sur les coupes de foie normal et ceci s'explique sans doute par la disparition du glycogène.

2. Pancréas.

Nous pouvons faire à ce niveau des observations analogues. Les colorations témoins sont uniformes, en général assez soutenues à cause sans doute de la présence des grains de zymogène.

Les réactions fortement positives sont là encore le fait des zones fortement parasitées et infiltrées et sont surtout



PHOTO 23 - x 50 - Tissu pancréatique sain.

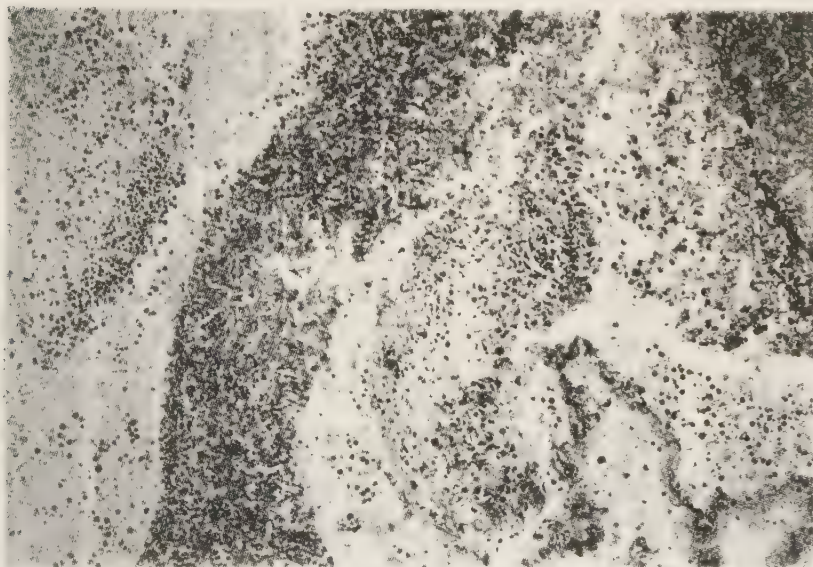


PHOTO 24 - x 50 - Tissu pancréatique très parasité - Oedème important - Grande quantité de tissu fibrinoïde.

localisées au niveau des plages de substance fibrinoïde. Pour le tissu pancréatique parasité, nous avons pu lire les résultats fournis par

- la réaction à l'azométhine (rad. NH_2).
- la réaction de Millon (rad. cycliques).
- la réaction de Glenner (rad. cycliques).
- la réaction au D.D.D. (rad. soufrés).

C - Concernant les lipides

Les préparations colorées au Noir Soudan montrent la présence de lipides complexes au niveau des zones parasitées ainsi que des gouttelettes des mêmes lipides dans le cytoplasme des flagellés (photos 28 et 29).

III. Discussion

La réaction P.A.S., jumelée à l'épreuve de l' α amylase salivaire, a permis de mettre en évidence :

- l'importance de la teneur en glycogène de Trichomonas vaginalis. Ce fait constitue la vérification cytochimique des résultats obtenus grâce à des dosages biochimiques par plusieurs auteurs et rapporté par MICHAELS (69) où le glycogène représente environ 20 p. cent du poids sec de la cellule.
- le "tropisme glycogénique" que présente Trichomonas vaginalis. Abordant le foie par l'extérieur, ce que confirme l'histologie, le flagellé provoque à son contact et même à distance la déplétion glycogénique des hépatocytes. Ce phénomène est d'autant plus net et généralisé que le parasitisme est plus important.

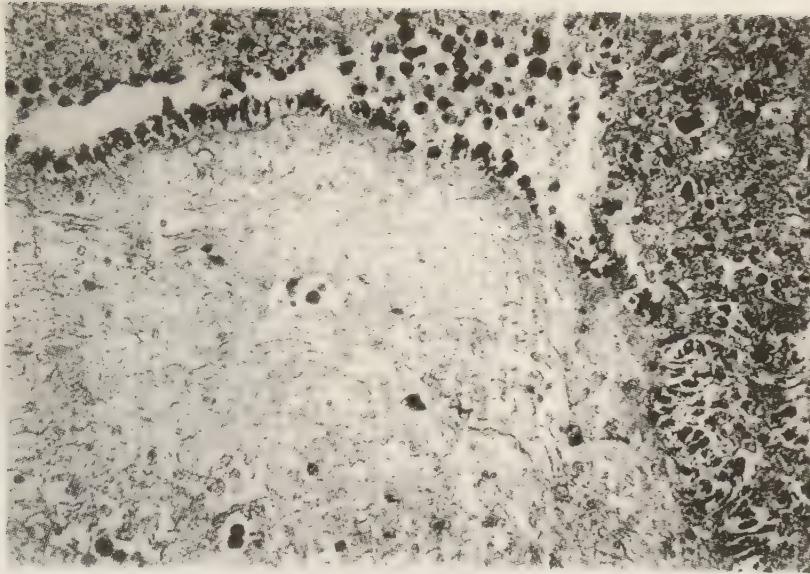


PHOTO 25 - x 120 - Alignement de flagellés rangés en "palissade."

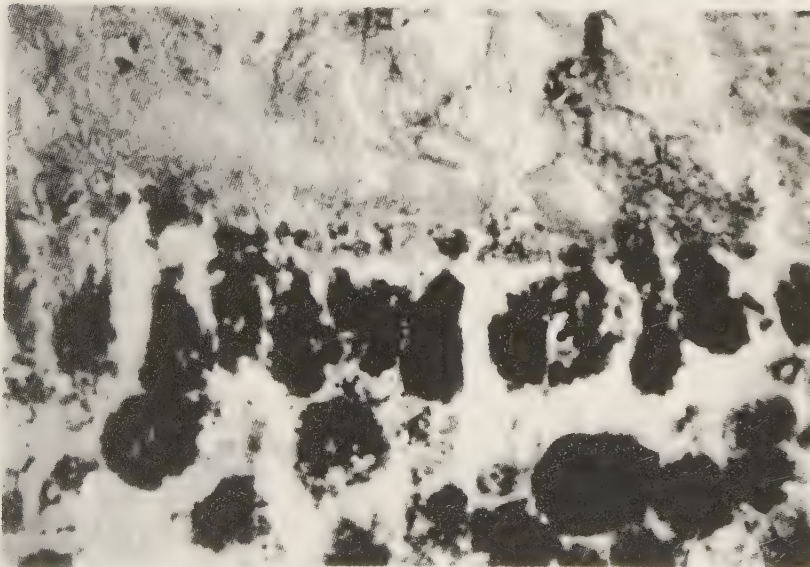


PHOTO 26 - x 800 - Même préparation montrant les flagellés colorés en rouges la substance orangée et les cellules fibroblastiques.

Ce phénomène histologique est à rapprocher de la baisse de la glycémie chez les souris très parasitées comme nous le signalons dans le chapitre V.

- la fragilité du pancréas vis à vis de l'invasion des flagellés. Le tissu pancréatique est rapidement altéré et dissocié de telle sorte que les images réactionnelles en couches successives que nous venons de décrire sont bien moins nettes dans cet organe que dans le foie.
- Il semble que ce soit au niveau des plages d'infiltrat fibrinoïde que les groupements protidiques détectables se trouvent concentrés.

IV. Conclusion

- la présence de Trichomonas vaginalis dans le foie et le pancréas détermine une réaction inflammatoire typique dont nous avons décrit plus haut les principaux éléments : infiltration histiocytaire ou leucocytaire et présence de substance fibrinoïde.
- on constate dans le foie parasité un appauvrissement important des hépatocytes en glycogène au profit, tout au moins en partie, des flagellés qui se présentent comme une sorte de "pompe" à glycogène.
- L'abord, par le parasite, des organes par la périphérie semble bien confirmé.
- L'étude histochimique nous apprend que la substance fibrinoïde est constituée en partie par des mucopolysaccharides neutres.
- En ce qui concerne les protides et les lipides, l'étude histochimique a permis de les localiser surtout au niveau des zones parasitées.

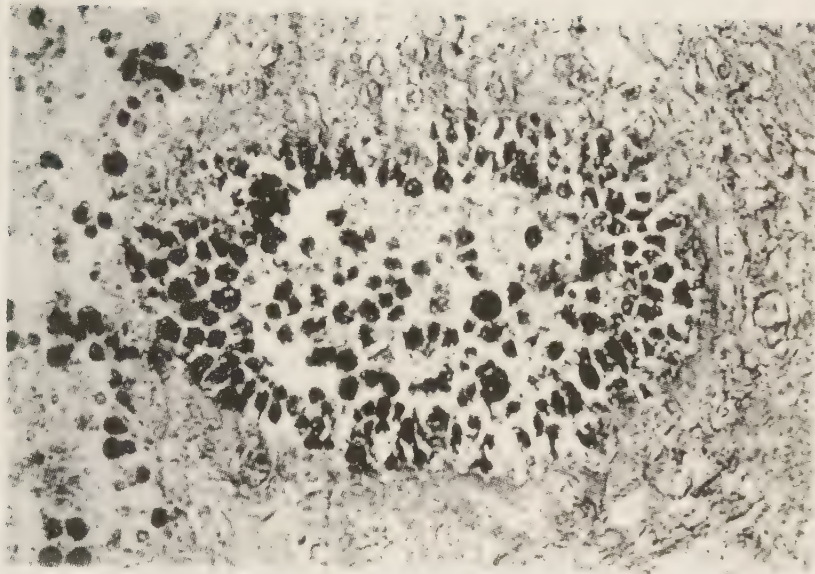


PHOTO 27 - x 320- Couloir de pénétration des flagellés au sein du tissu pancréatique.

- Le flagellé semble lui-même très riche en lipides complexes.
- La substance fibrinoïde a une structure complexe de nature glycoprotéique ; la partie protéique peut contenir des formations aussi variées que les cycles indol ou pyrrol, le radical phénol ou les groupements -SH et -S-S-.

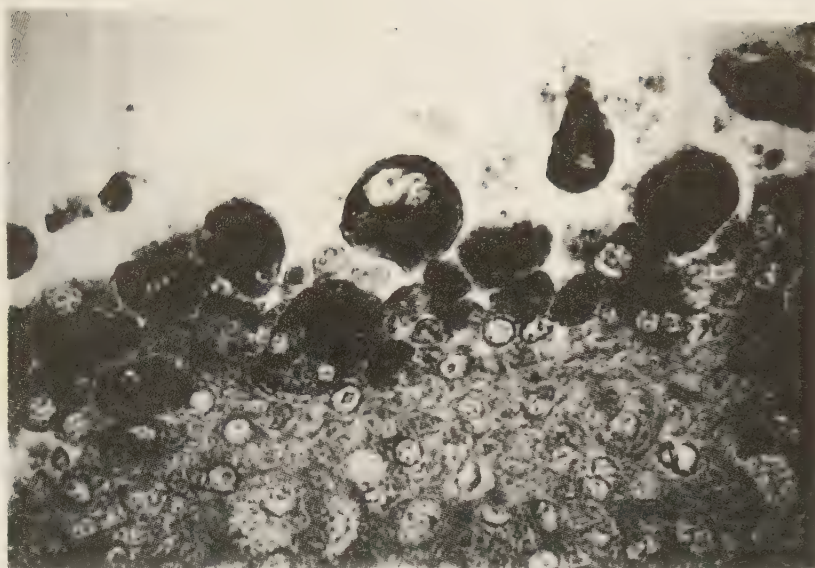


PHOTO 28 - x 320 - Tissu parasité coloré au noir soudan. Remarquer la grande quantité de gouttelettes de lipides complexes dans les flagellés.

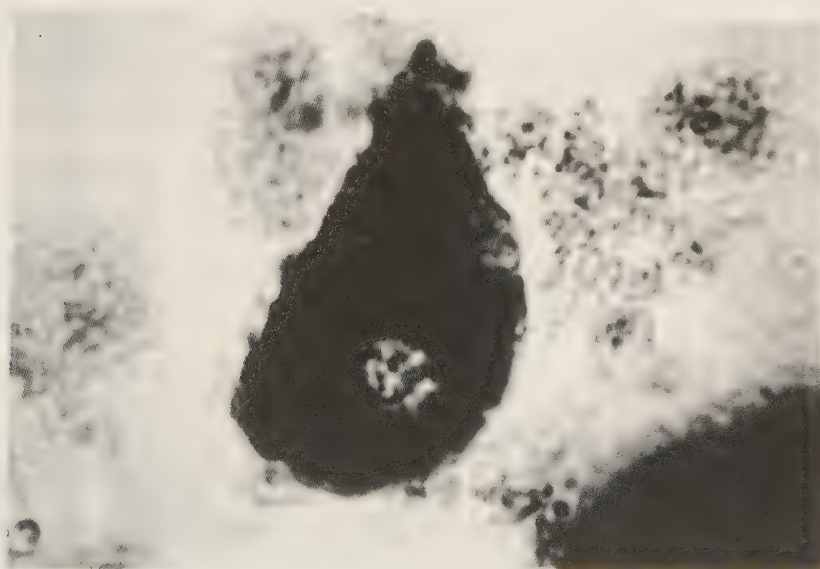


PHOTO 29 - x 1200 - Même préparation montrant un flagellé coloré au noir soudan.

CHAPITRE V

Modifications humorales au cours de l'endoparasitisme

de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris

Les conséquences de l'endoparasitisme de *Trichomonas vaginalis* chez la Souris sur certaines composantes biochimiques de l'animal parasité a fait l'objet de quelques expériences qui poursuivaient un double but :

- apprécier les répercussions que pouvaient avoir les lésions hépatiques et pancréatiques que nous ~~venons~~ de décrire sur les secteurs métaboliques dans lesquels ces organes sont impliqués ainsi que la part qui pouvait être faite au métabolisme propre du parasite ;

- essayer de définir un ou plusieurs critères biochimiques, faciles à déterminer et à suivre, qui seraient alors utilisables pour connaître, sans sacrifier l'animal, l'état d'infestation d'un sujet parasité ; en effet, chez l'animal peu ou moyennement infesté, il n'est pas possible d'observer de symptômes très nets au niveau de l'état général ou du comportement.

D'autre part, les méthodes directes d'observation telles que la radiographie et la scintigraphie s'avèrent encore impraticables compte tenu du pouvoir de résolution des appareillages par rapport à la taille de la Souris.

I. Matériel et méthodes

A - Animaux

Souris Swiss Webster CF₁.

Les souris n'ont reçu à aucun moment de traitement préparant (H.E.P., azathioprine ...)

Le sang est recueilli après section des vaisseaux du cou dans des conditions convenables.

Dans le cas où les animaux doivent être conservés vivants, le sang est prélevé au bout de la queue.

B - Souches

S₈

S₁₂

S₁₂ pathogène.

S₁₃ pathogène.

C - Méthodes de dosage

1. Ornithine carbamyl transférase

a - Principe

La réaction catalysée par l'O.C.T. s'écrit :

Citrulline + Phosphate $\rightleftharpoons$ Ornithine + Carbamyl phosphate.

In vitro, on a montré que

citrulline + arséniate $\longrightarrow$ ornithine + carbamyl arséniate
dans laquelle le carbamyl arséniate instable se décompose immédiatement en :



L'ammoniac est sélectivement adsorbé sur une résine échangeuse d'ions (HUTCHINSON, LABBY (44)). Il est élué de la résine et on détermine au colorimètre la quantité d'azote ammoniacal (MILLER, RICE (74)) grâce à la coloration développée par le réactif de BERTHELOT (10) au phénate-hypochlorite. On détermine l'activité enzymatique du sérum.

b - Réactifs

Nous utilisons les coffrets "Sigma" et "Hyland" contenant l'ensemble des réactifs prêts à l'emploi.

c - Mode opératoire

Dans des tubes à hémolyse, faire incuber, pendant 24 heures, les mélanges indiqués ci-dessous :

	Témoin	Dosage
Sérum	0,05 ml	0,05 ml
Eau distillée sans ammoniac	0,95 ml	0,95 ml
Tampon arséniate	1 ml	-
Tampon citrulline arséniate	-	1 ml

Faire ensuite adsorber, dans un tube à centrifuger, sur 0,2 ml de suspension de résine, l'ammoniac contenu dans les 2 ml du témoin et du dosage.

Agiter pendant 5 minutes.

Rincer à deux reprises avec 10 à 12 ml d'eau distillée sans ammoniac. Eliminer chaque fois le surnageant puis ajouter dans chaque tube

NaCl 4 N 1 ml.

Réactif au phénol 1 ml.

Agiter puis laisser en contact pendant 3 minutes ; ajouter alors la :

Solution d'hypochlorite 1 ml.

La réaction se développe pendant 15 minutes à 37°C et la lecture est effectuée au spectrophotomètre "Maroc" de Jobin et Yvon à 630 m μ .

Le résultat est lu sur une courbe étalon et exprimé en unités Sigma, c'est-à-dire par le nombre de millimicromoles de NH₃ dégagé par ml et pendant 24 heures.

Nous avons effectué une telle détermination chez 25 souris neuves et 25 souris ayant reçu 250.000 flagellés de la souche S₁₂ pathogène.

Les souris sont sacrifiées 3 semaines après l'infestation en même temps que les souris neuves.

2. Amylase

a - Principe

La méthode est fondée sur l'étude de l'action amyloclastique de l'enzyme, appréciée après incubation et addition d'iode permettant de doser la quantité d'amidon non hydrolysée. [VAN LOON et collaborateurs (109)] .

b - Réactifs

Solution tampon-phosphate à pH 7,4

- Sol. KH_2PO_4	M/1,5	19 ml.
- Sol. Na_2HPO_4	M/3	162 ml.
- Eau distillée		q.s.p. 1000 ml.

- Solution d'amidon soluble R.P. à 3 p. 100 dans le tampon à pH 7,4
- Solution d'HCl N
- Solution d'iode environ 0,1 N
- Solution d'iode N/3000 préparée extemporanément par dilution de la solution 0,1 N dans de l'eau distillée.

c - Mode opératoire

Réaliser, dans des tubes à essai, les mélanges suivants :

	Témoin	Dosage
Sol. d'amidon	2 ml.	2 ml.
Tampon	1,5 ml.	1,5 ml.
Sérum dilué au 1/5 ^e	-	0,5 ml.

Mélanger, porter à 38°C pendant 30 minutes, puis ajouter :

HCl	1 ml.	1 ml.
Sérum dilué au 1/5 ^e	0,5 ml.	-

Compléter le contenu de chaque tube à 20 ml avec de l'eau distillée ; après mélange, prélever dans chaque tube 1 ml de liquide que l'on ajoute à 10 ml de solution d'iode N/3000.

La lecture s'effectue au spectrophotomètre "Maroc" à la longueur d'onde de 630 mμ.

Lire le résultat sur une courbe étalon établie à l'aide de sérums "Versatol" normaux et pathologique d'activité enzymatique connue.

Nous avons traité le sérum de :

- 25 souris neuves.
- 25 souris infestées avec 250.000 flagellés de la souche S_{12} pathogène.
- 25 souris infestées avec 250.000 flagellés de la souche S_{13} pathogène.

3. Glucose

a - Principe

Le dosage du glucose est pratiqué à l'aide d'un Auto-analyseur Technicon et la méthode utilisée (HOFFMAN (33)) est fondée sur la réaction colorée d'oxydo-réduction du ferricyanure de potassium en ferrocyanure.

La lecture est effectuée à la longueur d'onde de 420 m μ .

b - Réactifs

Nous utilisons les réactifs fournis pour le fonctionnement de l'Auto-analyseur.

c - Mode opératoire

Le sang est recueilli sur fluorure de sodium et centrifugé. Le plasma est décanté avant d'être introduit dans l'appareil. Nous avons effectué cette détermination sur :

- 20 souris neuves.
- 25 souris infestées avec 250.000 flagellés de la souche S_{12} pathogène.
- 25 souris provenant de plusieurs lots ayant reçu des inoculum de l'ordre de plusieurs millions de flagellés de la souche S_8 (entre $7,5.10^6$ et 20.10^6).

4. Urée

a - Principe

Le dosage de l'urée est effectué en même temps que celui du glucose et sur le même échantillon à l'aide de l'Auto-analyseur Technicon.

On utilise la réaction de l'urée avec la diacétylmonoxime (SKEGGS (96) et MARSH et collaborateurs (68)).

En solution acide, la diacétylmonoxime s'hydrolyse en diacétyle qui réagit directement sur l'urée en présence d'alun ferrique pour former des dérivés triaziniques par condensation oxydative dont la coloration est appréciée à 480 m μ .

b - Réactifs

Nous utilisons les réactifs fournis pour le fonctionnement de l'Auto-analyseur.

c - Mode opératoire

Le sang est recueilli dans les mêmes conditions que pour le dosage du glucose.

Les lots de souris sont les mêmes que ceux utilisés pour la détermination de la glycémie.

5. pH

Les examens ont été effectués avec un appareil Radiometer de type PHM₂₇ comportant une microélectrode de verre E 5021 et une électrode au calomel munies d'enceintes à thermostat.

Ce système permet d'utiliser des échantillons de 20 microlitres. On opère sur du sang total recueilli sur héparine et conservé dans la glace fondante jusqu'au moment de la mesure.

Nous avons effectué les mesures sur :

- 20 souris neuves.
- 20 souris ayant reçu 4.10^6 flagellés de la souche S_{12} et intensément parasitées.

6. Protides sanguins

a - Protides totaux

Les protides du sérum ont été mesurés à l'aide d'une méthode cinéto-densimétrique.

Un tube cylindrique vertical contient un liquide non miscible à l'eau et porte gravés deux repères entre lesquels on mesure le temps de chute, au cinquième de seconde près, d'une goutte de sérum de 10 mm^3 de volume. On mesure de la même façon la vitesse de chute d'une goutte de solution étalon de même volume et de densité connue. Le résultat est lu sur une abaque établie dans diverses conditions de température. (DEPRAITERE, DE TRAVERSE, COQUELET (20)).

b - Electrophorèse des protéines sériques

Conditions techniques :

- Bandes Cellogel.
- Tampon véronal sodique 0,04 M pH 9,2.
- Dépôt : $0,5 \mu\text{l}/5\text{mm}$ (micro électrophorèse).
- Temps de migration : 15-20 min. sur 20-25 mm.
- Voltage : 200 volts.

- Coloration : Amido Schwarz : 0,50 g dans méthanol 50 ml.
Eau 40 ml.
Ac. acétique 10 ml.
- Décoloration : Méthanol 500 ml.
Acide acétique 100 ml.
Eau 400 ml.
- Diaphanisation : Diacétone alcool 8 ml.
Acide acétique 10 ml.
Méthanol 50 ml.
Eau 32 ml.
- Lecture : Densitomètre Vernon , type T.R.D.

c - Immunoélectrophorèse
.....

Nous avons utilisé une technique dérivée de celle de GRABAR (28) et de la microméthode mise au point par SCHEIDEGGER (88).

- Véronal 1,34 g.
 - Véronal sodique 10,30 g.
 - Eau q.s.p. 1000 ml.
-
- Dépôt : 1 μ l.
 - Migration : 2 heures 150 volts.
 - Immun Sérum de chèvre anti-Souris normal.
 - ImmunSérum de chèvre anti γ G (ou I.G.G.) de Souris.

II. Résultats

A - Ornithine carbamyl transférase sérique

La moyenne statistique des déterminations effectuées sur le sérum des souris neuves s'établit à 3287 ± 820 unités Sigma par ml.

Celle pour les souris malades est de 5219 ± 1737 (voir la figure 3 p. 119).

La valeur comparative des moyennes obtenues et de celles qui suivent est appréciée en utilisant le test de Student-Fischer dont la formulation s'établit ainsi :

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}} \sqrt{\frac{(n_1 + n_2 - 2) n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}$$

où n_1 et n_2 sont la taille des échantillons :

$\bar{X}_1$ et $\bar{X}_2$ leur moyenne statistique

S_1^2 et S_2^2 leur variance = $\frac{\text{Carré des écarts à la moyenne}}{\text{taille des échantillons.}}$

Le nombre de degrés de liberté s'établit ainsi :

$$V = n_1 + n_2 - 2 .$$

On effectue la lecture du τ sur le tableau de Student-Fischer (cette valeur découle de V et du seuil de confiance choisi).

Si $|t| > \tau$ les effets constatés dans les deux lots ne peuvent découler d'une même loi normale et, en conséquence, la différence des moyennes $(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)$ est significative. Elle ne l'est pas si $|t| < \tau$

Dans le cas de l'O.C.T., le calcul donne $t = 4,8$ alors qu'avec un nombre de degrés de liberté $25 + 25 - 2 = 48$ et pour un seuil de confiance de 0,95 T s'établit entre 2,00 et 2,04 ainsi que pour tous les autres dosages.

Nous pouvons en conclure que l'augmentation de l'O.C.T. sérique, chez la Souris au cours de l'infestation intrapéritonéale par la souche S_{12} pathogène, est nettement significative.

B - Amylase sérique

- La moyenne statistique chez les 25 souris neuves est de 2580 ± 227 .
- Celle avec la souche S_{12} pathogène est de 2810 ± 213 .
- Celle avec la souche S_{13} pathogène est de 2860 ± 225 .
(voir figure 3 p.119).

L'application du test de Student-Fischer donne :
 $t = 3,09$ en comparant les moyennes souris neuves et souris- S_{12} pathogène.
 $t = 4,25$ en comparant les moyennes souris neuves et souris- S_{13} pathogène.

Les différences sont donc significatives.

C - Glucose plasmatique

Les 20 résultats correspondant aux souris neuves ont une moyenne statistique de $1,60 \text{ g/l} \pm 0,27$.

Cette moyenne recoupe donc de façon satisfaisante celle obtenue par HUESTLAND, HADLEY, MERCER, SANDCOCK (32), qui utilisant une méthode dont le principe est très proche de la nôtre mais non automatisée, trouvent $1,74 \text{ g/l}$.

La moyenne correspondant aux 25 animaux intensément infestés est de $0,97 \text{ g/l} \pm 0,12$ (voir figure 3 p. 119).

L'application du test de Student-Fischer à la comparaison de ces deux moyennes fournit un $t = 10,45$, ce qui est, bien sûr, très significatif.

Au début de cette investigation, nous avons utilisé, pour la détermination de la glycémie, des lots de souris moyennement parasitées par la souche S_{12} pathogène ; sur les 25 dosages effectués avec de tels lots, la moyenne statistique est de $1,57 \text{ g/l}$, ce qui est très proche de la moyenne des souris neuves et donc non significatif.

D - Urée

Les moyennes statistiques obtenues sont les suivantes :

- | | |
|------------------------------------|------------------------|
| - 20 souris neuves | = $0,41 \text{ g/l}$. |
| - 25 souris moyennement parasitées | = $0,40 \text{ g/l}$. |
| - 25 souris intensément infestées | = $0,45 \text{ g/l}$. |

La comparaison de ces moyennes par le test de Student-Fischer ne montre aucune différence significative puisque, si l'on compare, en particulier souris neuves et souris intensément parasitées, $t = 1,4$ alors que le T est, rappelons-le, voisin de $2,03$ pour un seuil de confiance de $0,95$ et de $1,69$ pour un seuil de confiance de $0,90$.

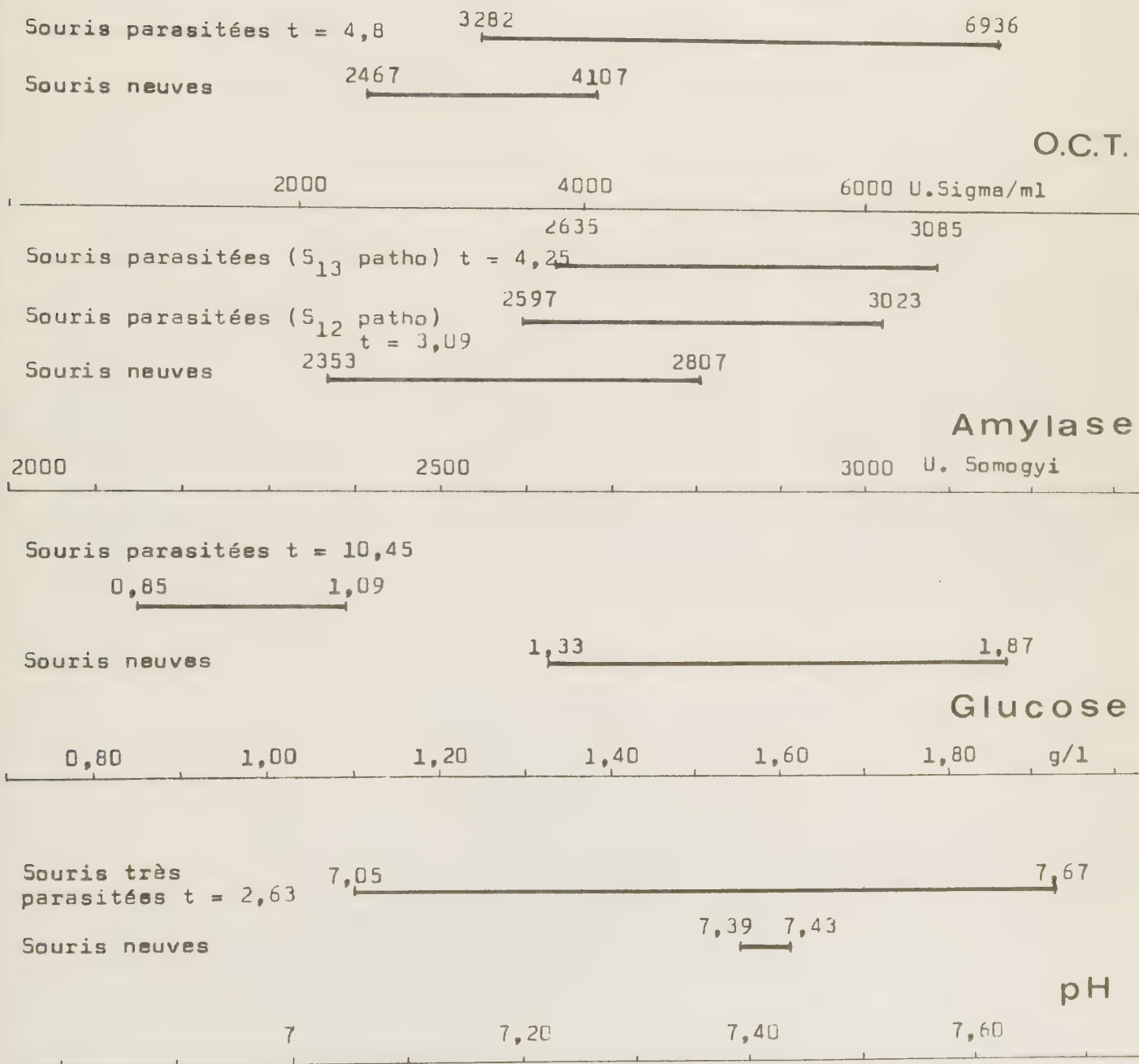
E - pH sanguin

Les moyennes statistiques obtenues sont les suivantes :

- | | |
|------------------------------------|-----------------------|
| - 20 souris neuves | = $7,408 \pm 0,019$ |
| - 20 souris intensément parasitées | = $7,365 \pm 0,310$. |

Figure 3

Représentation graphique des résultats de certaines caractéristiques sanguines de souris parasitées.



En appliquant le Student-Fischer pour ces deux moyennes $t = 2,63$ qui est donc situé entre un seuil de confiance de 0,95 et de 0,99. (voir figure 3, p. 119).

F - Protides

1. Protides_totaux

La quantité normale de protides sériques totaux est de 75 à 80 g/l. On a pu trouver chez des souris infestées des taux de protides variables, pouvant s'abaisser jusqu'à 55 g/l.

2. Séparation_par_électrophorèse

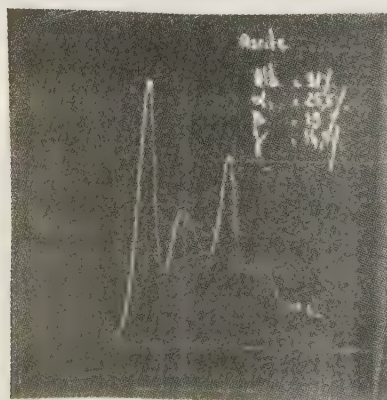
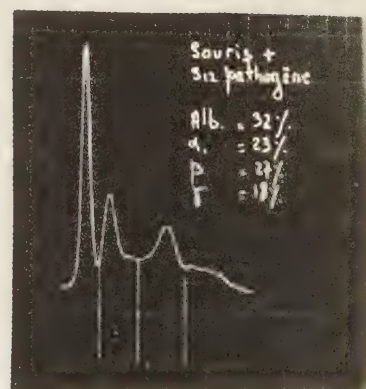
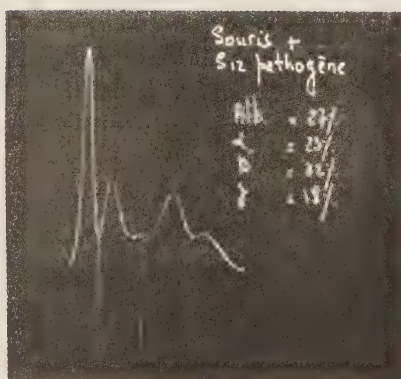
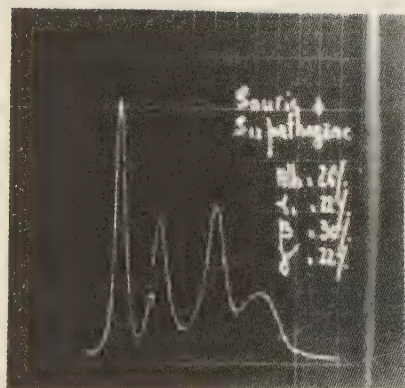
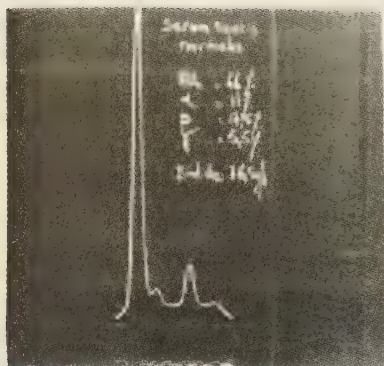
Pour établir les valeurs normales, nous avons effectué à plusieurs reprises une électrophorèse sur un mélange de sérums de souris neuves (photo 1).

Nous n'avons pas trouvé dans la littérature de résultats disponibles auxquels nous pourrions comparer les nôtres ; à défaut, nous empruntons à MOORE (76) ceux qu'il a obtenus chez le Rat :

Albumine	65	p.	100
α_1	13	"	"
α_2	15	"	"
β_1	13	"	"
γ	4	"	" .

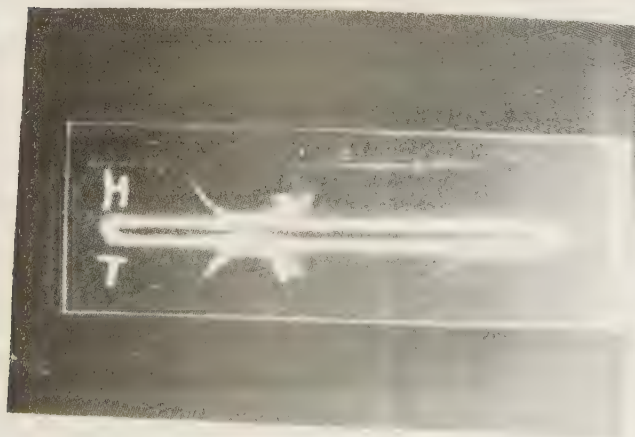
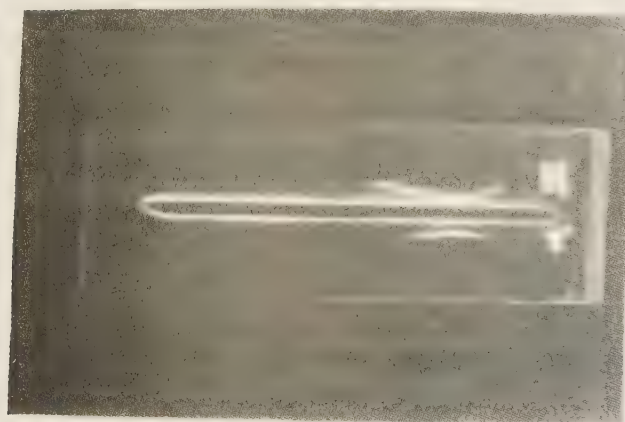
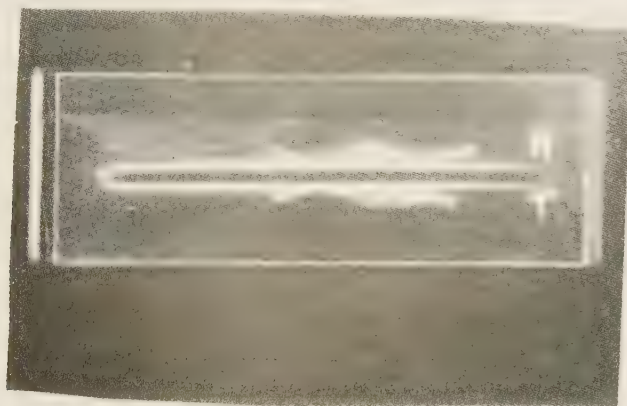
Nous donnons ci-dessous trois immunoélectrophorègrammes fournis par des souris parasitées ayant reçu des flagellés de la souche S₁₂ pathogène : on y constate une diminution de l'albumine et une augmentation de toutes les fractions globuliniques, en particulier les I.G.G. globulines.

Un tracé correspondant à un liquide d'ascite donne à peu près les mêmes pourcentages.



3. Séparation par immunoelectrophorèse

Les résultats obtenus en immunoelectrophorèse confirment les précédents. On note l'augmentation des I.G.G. globulines, sans apparition de paraprotéine monoclonale.



III. Discussion

A - Ornithine carbamyl transférase

REICHARD et collaborateurs (85) rapportent que chez les Mammifères l'O.C.T. se trouve presque exclusivement dans les cellules du foie et qu'une augmentation de l'activité de cette enzyme dans le sérum est un signe spécifique d'altération hépatique. En particulier, la spécificité est plus grande que celle de l'augmentation de la transaminase glutamicopyruvique du sérum (S.G.P.T.) en cas de cytolysé hépatique telle qu'on peut l'observer au niveau du foie des animaux parasités par Trichomonas vaginalis. Il est intéressant de préciser que la détermination de l'activité de l'O.C.T., chez une dizaine d'animaux parasités faisant partie du même lot, mais pratiquée 4 jours seulement après infestation, n'a pas révélé d'augmentation significative par rapport à la normale ($t = 0,16$). Cela tend à prouver que l'on ne peut se servir de ce dosage pour déterminer précocement la réussite de l'implantation.

B - Amylasémie

ADLER (1) note que Trichomonas vaginalis incorpore des grains d'amidon, non seulement dans son cytoplasme mais encore dans son noyau. Ces grains sont graduellement digérés, ce qui prouve la présence d'amylase dans le caryoplasme.

Pour notre part, nous avons effectué une détermination de l'amylase sur une population de 250.000 flagellés, par la méthode chimique. Les valeurs retrouvées sont à un niveau trop faible pour pouvoir interférer dans la détermination de l'amylasémie chez la Souris infestée.

C - Glycémie

L'attaque du pancréas et du foie nous laissait supposer que les lésions au niveau de ces organes étaient capables d'entraîner des perturbations dans la régulation de la glycémie. Mais l'utilisation de lots de souris moyennement parasitées nous a donné une moyenne statistique pratiquement égale à celle trouvée chez les souris neuves et ce résultat nous a conduit à utiliser des souris intensément infestées qui, elles, voient leur glycémie s'effondrer.

Cela nous permet d'avancer deux hypothèses :

- pour que la glycémie soit abaissée, il faut que tous les organes soient profondément attaqués, et en particulier le pancréas.
- que le nombre très important de flagellés présents dans la cavité péritonéale fasse secondairement baisser le taux sanguin du glucose *.

C'est vers cette dernière hypothèse que nous inclinons car les souris intensément parasitées proviennent de lots ayant plusieurs caractéristiques :

- emploi de la souche S₈ très réfractaire et donc utilisation d'inoculats contenant plusieurs millions d'individus;
- sacrifice des souris rendu de ce fait nécessaire au bout de 5 jours. Les organes comme le foie et le pancréas ne présentent pas de nécrose bien précise mais baignent au sein d'une sorte d'ascite de 2 à 3 ml contenant de 25 à 30 millions de parasites par ml. Nous avons vu, dans le chapitre consacré à l'histochimie, que la présence de parasites à la périphérie du foie a pour effet de priver les hépatocytes de leur glycogène, même s'ils sont éloignés de la zone envahie par les flagellés.

* ASAMI et NAKAMURA (3) avaient déjà montré que la quantité de glucose dans le mucus vaginal varie de façon inversement proportionnelle au nombre de flagellés dans la cavité vaginale.

D - pH sanguin

Comme nous l'avons vu, le métabolisme glucidique de Trichomonas vaginalis aboutit à la formation de plusieurs acides dont l'acide lactique et l'acide malique sont les principaux représentants. L'apparition de ces métabolites a pour effet d'acidifier les milieux de culture et les mesures du pH de plusieurs échantillons d'ascite nous donne des résultats qui confirment *in vivo* ce qui se passe *in vitro*.

En effet, nous constatons que le pH varie entre 4,8 et 5,2.

La détermination du pH sanguin de souris infestées tendait à dépister un éventuel état d'acidose provoqué par la diffusion d'un excès de substances acides dans le sang.

Cette acidose s'observe en effet chez des animaux intensément parasités mais elle reste faible. La souris doit compenser par elle-même assez efficacement la libération des acides par Trichomonas vaginalis.

E - Protides

- En ce qui concerne les protides totaux, nous n'attachons pas pour l'instant à ces variations une signification particulière sur le plan de la spécificité.

- Les résultats de l'électrophorèse et de l'immunoélectrophorèse n'apportent aucune surprise quant aux conséquences de l'infestation sur le plan immunologique.

IV. Conclusion

Chez les souris parasitées, nous observons une nette élévation :

- du taux d'O.C.T.. La nécrose hépatique provoquée par les flagellés en est certainement responsable;
- du taux de l'amylase sérique ; cette élévation est sans doute due à l'attaque pancréatique.

En revanche, la glycémie s'effondre chez les souris intensément infestées : selon nous, ce fait est à imputer davantage au métabolisme glucidique intense d'un grand nombre de flagellés présents qu'aux lésions pancréatiques ou hépatiques de la Souris.

Le taux d'urée sanguine n'est pas modifié.

Le pH sanguin tend à diminuer sous l'influence de la production de métabolites acides. Cette acidose est le plus souvent bien compensée.

Enfin, les protides présentent les changements observables au cours des processus de nature immunologique lors de l'introduction d'un matériel étranger, c'est-à-dire l'augmentation des fractions globuliniques, en particulier de l'I.G.G. globuline.

Ainsi, parmi tous les éléments du tableau biochimique contemporain de l'endoparasitisme de Trichomonas vaginalis, aucun n'est capable à lui seul de signer avec certitude la réalité et l'importance de l'infestation. Sans doute pouvons-nous, en associant plusieurs dosages, parvenir à déterminer l'état parasitaire approximatif d'un animal mais, dans ces conditions, la complexité

relative de ces examens et le temps que demande leur réalisation leur enlève beaucoup de leur utilité pratique.

Il manque donc la méthode d'exploration rapide et sûre qui permette de déterminer à tout moment l'état exact du parasitisme de nos animaux sans avoir à les sacrifier.

Le perfectionnement de méthodes optiques, comme la laparoscopie, le microcinéma ou la télévision, ou physiques, comme l'utilisation de flagellés marqués, permettra peut-être un jour de suivre, quand on le désire, un organe ou une partie d'organe sans provoquer de traumatisme.

Cette possibilité serait extrêmement féconde car elle donnerait une conception dynamique du contact d'un hôte avec un parasite.

CHAPITRE VI

Essais d'implantation chez la Souris de la Souche S_g

réfractaire à l'endoparasitisme

Dans nos expériences préliminaires, la souche S_g, entretenue depuis 10 ans en culture, sur milieu de Magara, s'est toujours montrée réfractaire à une quelconque implantation chez la Souris, en dépit du traitement préalable de l'animal par des hématies de Poulet, et des doses infestantes importantes utilisées. Or, le milieu de Magara comporte de la pénicilline et les travaux de STALDER, HCNIGBERG et KING (99) ont montré que cet antibiotique, ainsi que la streptomycine, étaient capables de diminuer la virulence de Trichomonas gallinae.

En 1961, la même souche avait permis à GEORGES d'obtenir des résultats positifs comparables à ceux d'INOKI.

Nous rapportons ici les tentatives effectuées pour restituer à la souche S_g son pouvoir pathogène.

Nous avons déjà observé et décrit que l'endoparasitisme de Trichomonas vaginalis chez la Souris se manifeste d'abord au niveau du pancréas et au niveau du foie. Ce tropisme pancréatique

et hépatique nous permettait d'envisager la possibilité de créer un pouvoir pathogène chez les flagellés, en les cultivant, in vitro, en présence d'un broyat de pancréas ou de foie de Souris. Certaines souches, S_{12} , S_{13} , S_{14} , traitées dans ces conditions, nous avaient d'ailleurs valu des résultats encourageants.

D'autre part, nous avons prouvé la possibilité de transmission, de génération à génération, du caractère pathogène acquis par certaines souches. Nous avons alors cherché à savoir si la culture de la souche S_8 en présence d'un homogénéisat de flagellés appartenant à la souche S_{12} , normale ou pathogène, pouvait faire réapparaître, chez la souche S_8 , un ou plusieurs caractères qu'elle avait apparemment perdus, au cours de sa longue conservation en culture.

Nous avons également pensé à combiner les deux traitements précédents en cultivant la souche S_8 en présence, à la fois, d'un broyat pancréatique ou hépatique et d'homogénéisat de la souche S_{12} .

Toutes les expériences fondées sur ces trois principes ont été menées de front.

Enfin, nous avons étudié le comportement de la souche S_8 , traitée selon les modalités précédentes et ensuite inoculée à des souris préalablement préparées, soit par des hématies d'embryon de Poulet, soit par l'azathioprine.

Il est important de signaler, dès maintenant, que cette dernière partie de notre travail est intervenue plus tardivement, au vu de l'évolution des résultats observés chez les animaux non préparés.

I. Matériel et méthodes

A - Traitement de la souche S₈ :

1. Par addition de broyat, pancréatique ou hépatique :

Nous réalisons, à 48 heures d'intervalle, trois repiquages successifs des flagellés de la souche S₈ sur du milieu de Magara. Notons que le temps de contact est augmenté par rapport aux essais précédents. Au moment de chaque repiquage nous ajoutons 0,5 ml d'une suspension obtenue par trituration au mortier de pancréas ou de foie de souris, fraîchement prélevé, à raison de 1 g de tissu frais pour 3 ml de soluté isotonique ; ces opérations sont menées aseptiquement.

Ultérieurement, les repiquages sont régulièrement poursuivis, dans du milieu de Magara auquel aucun broyat tissulaire n'est alors ajouté.

Les souches ainsi traitées sont désignées, dans la suite de notre texte, sous les appellations S₈ + foie ou S₈ + pancréas.

Les animaux à infester, groupés le plus souvent par lots de dix individus, reçoivent :

- soit un inoculum provenant de la troisième culture menée en présence de broyat tissulaire ;
- soit un inoculum provenant des cultures ultérieures menées sans addition de broyat. Dans ce cas, une série d'animaux est inoculée chaque semaine.

2. Par addition d'un homogénéisat de *Trichomonas vaginalis*
de souche différente :

On réalise, à 48 heures d'intervalle, trois repiquages successifs des flagellés de la souche S_8 sur milieu de Magara. Au moment de chaque repiquage, nous ajoutons 1 ml de suspension de matériel cellulaire provenant du broyat mécanique, à l'aide de billes de verre *, d'une suspension de 150.10^6 flagellés par ml. L'efficacité de l'opération est constatée par vérification au microscope et par plusieurs cultures de la suspension obtenue, maintenue à 37°C pendant quinze jours. Aucun développement n'a été observé dans ces tubes de contrôle.

Ultérieurement, les repiquages sont régulièrement poursuivis dans du milieu de Magara auquel aucun homogénéisat n'est alors ajouté.

Les souches, ainsi traitées, sont désignées, dans la suite de notre texte, sous les appellations $S_8 + S_{12}$ normale ou $S_8 + S_{12}$ pathogène.

Les animaux à infester, groupés le plus souvent par lots de dix individus, reçoivent :

- soit un inoculum provenant de la troisième culture menée en présence d'homogénéisat ;
- soit un inoculum provenant des cultures ultérieures menées sans addition d'homogénéisat. Dans ce cas, une série d'animaux est inoculée chaque semaine.

* Appareillage VIBROGENE (BUHL) avec des billes de calibre 31/9 ; temps : 7 minutes.

3. Par addition d'homogénéisat de *Trichomonas vaginalis*

souche S₁₂ normale et de broyat pancréatique ou hépatique

Dans un premier temps, la souche S₈ subit d'abord trois repiquages successifs en présence d'homogénéisat de la souche S₁₂ puis, dans un second temps, trois repiquages successifs en présence de broyat d'origine pancréatique ou hépatique.

Ultérieurement, les repiquages sont régulièrement poursuivis dans le milieu de Magara où n'est plus ajouté ni broyat tissulaire, ni homogénéisat de protozoaires.

Les souches ainsi traitées sont désignées, dans la suite de notre texte, S₈ + S₁₂ + foie ou S₈ + S₁₂ + pancréas.

Les animaux à infester, groupés le plus souvent par lot de dix individus, reçoivent un inoculum provenant des cultures terminales menées sans addition d'aucune sorte. Une série d'animaux est inoculée chaque semaine.

Dans tous les cas (1, 2, et 3), 250.000 flagellés ont été injectés à chaque animal.

B - Traitement des souris :

Nous utilisons des souris femelles Swiss Webster CF₁, de race pure et exemptes de contamination bactérienne. Elles sont âgées de 6 semaines au moment de l'injection des flagellés et pèsent alors environ 20 g.

Les traitements préparants lorsqu'ils ont été réalisés, font appel soit à l'injection intra-veineuse de $1,5 \cdot 10^6$ hématies d'embryon de Poulet, soit à l'ingestion d'azathioprine à raison de 3 mg par kg et par jour pendant 3 jours. Notons que cette dose a été augmentée par rapport aux essais précédents.

Pour certains lots, ces deux modes de préparation ont été jumelés.

L'injection de Trichomonas vaginalis, par voie intrapéritonéale, intervient entre 48 et 72 heures après la fin du traitement préparant.

Dans tous les cas, les animaux sont sacrifiés au bout de trois semaines, délai maximum d'apparition de lésions graves chez les animaux dont l'infestation a été réussie.

II. Résultats

Les abcès qui peuvent être observés chez les animaux infestés sont, dans la plupart des cas, localisés au niveau du foie ou du pancréas. Toujours de très petite taille, ils sont tous examinés au microscope, après écrasement entre lame et lamelle. Cet examen permet de distinguer deux catégories d'abcès : la première groupe ceux où des trophozoïtes mobiles sont observables, la seconde, ceux dont l'examen microscopique ne permet pas de retrouver de formes mobiles.

Par ailleurs, tous les abcès de l'une ou de l'autre catégorie sont mis en culture sur milieu de Magara : cela permet, en ce qui concerne la seconde catégorie, de constater, soit l'échec de la culture, soit son développement : ce sont ces derniers abcès, fournissant une culture ultérieure positive que nous qualifions d'abcès à formes latentes.

Les résultats observés sont consignés dans les tableaux 9, 10, 11, 12.

Tableau 9

Souche	nbre de T.V.	nombre de souris	nbre d'abcès	nbre d'abcès à formes latentes
S_8	$3,2.10^6$	5	1	1
souris non préparées	$1,25.10^5$	10	0	0
	$2,5 .10^5$	20	0	0
S_8				
souris pré-	$3,5.10^6$	5	0	0
parées selon	$5 .10^5$	15	0	0
INOKI	$3 .10^5$	20	0	0

Tableau 10

Souche	nbre de T.V.	nombre de souris	nbre d'abcès	nbre d'abcès à formes latentes
S_8 + foie	250.000	30	1	0
S_8 + pancréas	250.000	29	1	0

Tableau 11

Souche	nbre de T.V.	nombre de souris	nbre d'abcès	nbre d'abcès à formes latentes
$S_8 + S_{12}$ normal	250.000	45	7	4
$S_8 + S_{12}$ normal + foie	250.000	45	4	3
$S_8 + S_{12}$ normal + pancréas	250.000	45	3	2
$S_8 + S_{12}$ pathogène	250.000	73	18	6

Tableau 12

Souche	nbre de T.V.	nbre de souris	nbre d'abcès	nbre d'abcès à formes latentes
$S_8 + S_{12}$ souris préparées	250.000	117	32	4

Enfin, les flagellés provenant des cultures d'abcès à formes mobiles, de loin les moins nombreux, ou d'abcès à formes latentes, ont été systématiquement injectés, par voie intra péritonéale, à raison de 250.000 flagellés par animal, à des souris neuves n'ayant subi aucune préparation (tableau 13).

Tableau 13

Souche	nbre de T.V.	nombre de souris	nbre d'abcès	nbre d'abcès à formes latentes
S_8 provenant d'abcès à formes latentes	250.000	107	10	1

Ces tableaux font apparaître le nombre total d'abcès et, parmi ceux-ci, le nombre d'abcès à formes latentes.

III. Interprétation mathématique et discussion :

Un certain nombre d'animaux avaient été inoculés avec la souche S_8 normale ou les souches S_8 traitées, depuis plus de quatre semaines. Dans ces conditions, il nous est rapidement apparu que, passé ce délai, les flagellés traités avaient perdu toute virulence. Aussi n'avons-nous pas reporté dans les tableaux 9, 10 et 11, les

résultats concernant les animaux injectés au cours de cette période et qui se sont révélés négatifs.

Les résultats ont pu être regroupés en raison de l'homogénéité des constatations expérimentales effectuées au niveau de chaque lot d'animaux.

Ainsi, les tableaux 9 et 10 montrent que, au cours des 14 premières séries d'essais portant sur 134 animaux, il n'a été observé qu'un seul abcès à formes latentes.

En revanche, dès que l'on procède à l'injection de flagellés S_8 cultivés en présence d'un homogénéisat de Trichomonas, les tableaux 11 et 12 font apparaître systématiquement, pour les 21 premières séries d'essais, portant sur 208 animaux, un nombre d'abcès bien plus élevé.

Enfin, pour le tableau 13, le nombre total d'abcès obtenu dans 11 séries expérimentales (107 animaux) mérite attention.

Des comparaisons ont été ainsi effectuées entre les différents lots d'animaux présentés dans le tableau récapitulatif 14.

Tableau 14

Souche	nbre de T.V.	nombre de souris	nbre d'abcès	nbre d'abcès à formes latentes
S ₈ seul S ₈ + foie ou S ₈ + pancréas	250.000	134	3	1
S ₈ + S ₁₂ souris non préparées	250.000	208	30	15
S ₈ + S ₁₂ souris préparées	250.000	117	32	4
S ₈ provenant d'abcès à formes latentes	250.000	107	10	1

Le calcul du χ^2 , en permettant de comparer deux à deux les différents lots expérimentaux inoculés au cours des 4 premières semaines d'expérimentation doit permettre d'apprécier la signification des résultats.

A - Souris non préparées

1. Comparaison du nombre total d'abcès obtenus, d'une part, avec la souche S_8 non traitée ou traitée par un broyat de tissu hépatique ou pancréatique, d'autre part, avec la souche S_8 traitée préalablement par un homogérisat de flagellés, S_{12} seul ou associé à un broyat tissulaire.

Tableau 15

Souche	Résultats	Valeur théor.	Ecart	Carré des écarts	Carré des écarts / Valeur théor.
S_8 seul et S_8 + foie ou S_8 + pancréas	Echecs 131	121,14	9,86	97,22	0,80
	Abcès 3	12,86	9,86	97,22	7,60
$S_8 + S_{12}$	Echecs 178	188,03	10,03	100,6	0,54
	Abcès 30	19,97	10,03	100,6	5,04
	Total souris 342				$\chi^2 = 13,98$
	Total abcès 33				

Le χ^2 est voisin de 14. Le problème étudié est à 1 degré de liberté, les tables donnent 3,84 avec un seuil de confiance de 0,95 et 6,64 avec un seuil de confiance de 0,99. La différence est donc significative et la culture de flagellés S_8 en présence d'un homogérisat de la souche S_{12} semble conférer à cette souche une virulence incontestable.

2. Comparaison du nombre total d'abcès à formes latentes obtenus dans les deux mêmes lots que ci-dessus.

Tableau 16

Souche	Résultats	Valeur théor.	Ecart	Carré des écarts	Carré des écarts / Valeur théor.
S ₈ seul et S ₈ + foie ou S ₈ + pancréas	Echecs 133	127,3	5,7	32,5	0,22
	Formes latentes 1	6,3	5,3	28,1	4,46
S ₈ + S ₁₂ normal et pathogène	Echecs 193	198,22	5,22	27,25	0,14
	Formes latentes 15	9,78	5,22	27,25	2,80
	Total souris 342				$\chi^2 = 7,62$
	Total abcès à formes la- tentes 16				

Le χ^2 est ici de 7,62. La différence est encore significative, même avec un seuil de confiance de 0,99 ($\chi^2 = 6,64$).

La différence qui apparaît en comparant le nombre total des abcès se retrouve donc en comparant le nombre total des abcès à formes latentes.

B - Souris préparées

1. Comparaison du nombre d'abcès obtenus, d'une part, avec la souche S_8 non traitée ou traitée par un broyat tissulaire, d'autre part, avec la souche S_8 traitée préalablement par un homogénéisat de flagellés, S_{12} seul ou associé à un broyat tissulaire.

Tableau 17

Souche	Résultats	Valeur théor.	Ecart	Carré des écarts	Carré des écarts / Valeur théor.
S_8 seul et S_8 + foie ou S_8 + pancréas	Echecs 131	115,24	15,76	248,38	2,15
	Abcès 3	18,76	15,76	248,38	13,24
$S_8 + S_{12}$	Echecs 85	100,62	15,62	243,98	2,42
	Abcès 32	16,38	15,62	243,98	14,89
	Total souris 251				$\chi^2 = 32,70$
	Total abcès 35				

Ce χ^2 de 32,70 est tout à fait significatif quel que soit le seuil de confiance choisi.

2. Comparaison du nombre d'abcès latents obtenus dans les deux mêmes lots que ci-dessus.

Tableau 18

Souche	Résultats	Valeur théor.	Ecart	Carré des écarts	Carré des écarts / Valeur théor.
S_8 seul et	Echecs 133	131,32	1,68	2,82	0,02
S_8 + foie ou	formes				
S_8 + pancréas	latentes 1	2,68	1,68	2,82	1,05
$S_8 + S_{12}$	Echecs 113	114,66	1,66	2,75	0,02
	formes				
	latentes 4	2,34	1,66	2,75	1,18
	Total souris 251				$\chi^2 = 2,27$
	Total à formes latentes 5				

Ce χ^2 de 2,27 n'est pas significatif et nous ne retrouvons pas ici les résultats comparables à ceux offerts par les tableaux 15 et 16. Il apparaît paradoxal d'envisager que le traitement préalable des souris puisse être mis en cause, car il a été suffisamment montré par ailleurs qu'il améliorerait le pourcentage de réussite. En revanche, il nous faut rappeler que cette dernière série d'expériences a été entreprise plus tardivement alors que les souches traitées en était à leur 18^e repiquage.

Ainsi, sommes-nous amenés à constater le fait que la virulence conférée aux flagellés se trouve plus ou moins transitoire. Elle a disparu aux environs du 12^e repiquage. En comparant

les résultats du tableau 17 et du tableau 18, on peut en conclure que la souche S_8 , cultivée en présence d'homogénéisat de la souche S_{12} a manifestement acquis un pouvoir agressif vis à vis de la Souris, comme le prouve le nombre total d'abcès observés : en revanche, ce pouvoir reste insuffisant pour se traduire par un nombre significatif d'abcès à formes latentes.

C - Comparaison du nombre total d'abcès obtenus, d'une part, avec la souche S_8 non traitée ou traitée par un broyat tissulaire, d'autre part, avec les souches S_8 provenant du développement, in vitro, d'abcès "à formes latentes".

Tableau 19

Souche	Résultats	Valeur théor.	Ecart	Carré des Ecart	Carré des Ecart / Valeur théor.
S_8 seul et	Echecs 131	127,3	3,7	13,7	0,11
S_8 + foie et	Abcès 3	7,24	4,24	17,58	2,48
S_8 + pancréas					
S_8 provenant	Echecs 97	101,65	4,65	21,62	0,21
d'abcès à	Abcès 10	5,78	4,22	17,81	3,08
formes latentes					
	Total souris 241				$\chi^2 = 5,88$
	Total abcès 13				

Dans ce cas, la valeur du $\chi^2 = 5,88$ se trouve entre celle obtenue avec un seuil de 0,95 et un seuil de 0,99. En considérant le nombre d'abcès, il apparaît que le passage chez l'animal n'entraîne pas, chez ces flagellés, l'acquisition d'un pouvoir pathogène capable d'être ultérieurement transmis de génération en génération, à la différence des souches S_{12} , S_{13} , S_{14} , comme nous l'avons déjà rapporté. Nous pouvons en conclure que le passage de Trichomonas vaginalis chez l'animal est une condition nécessaire mais non suffisante pour créer chez une souche un pouvoir pathogène transmissible héréditairement pendant une période plus ou moins longue.

Cette remarque se trouve confirmée par l'examen du résultat du tableau 20 et il n'est alors nullement besoin de calculer le χ^2 pour constater qu'il n'existe aucune différence entre les flagellés non modifiés (S_8 seul et S_8 + foie ou pancréas) et les flagellés, prélevés à partir des abcès à formes latentes.

Tableau 20

Souche	Résultats
S_8 seul et S_8 + foie ou pancréas	Echecs 133
	Formes latentes 1
S_8 provenant d'abcès à formes latentes	Echecs 106
	Formes latentes 1
	Total souris 241
	Total abcès à formes latentes 2

IV. Conclusion

A - En ce qui concerne l'endoparasitisme expérimental chez la Souris, la souche S₈ présente un comportement biologique particulier puisqu'elle se montre très réfractaire.

B - Le fait que cette souche ait pu donner, en 1961, des résultats favorables nous permet de conclure que le vieillissement provoqué par une culture prolongée, in vitro, peut être rendu responsable de la disparition d'un caractère que l'on retrouve chez les souches plus jeunes.

C - Ce caractère, une fois perdu, semble difficile à récupérer :

1. L'addition d'un broyat de tissu, foie ou pancréas, pour lequel le parasite semble montrer une affinité évidente, n'entraîne aucune modification de la virulence de la souche S₈, contrairement aux espoirs suscités par certains résultats encourageants, obtenus à partir d'autres souches beaucoup plus jeunes.

2. Dans notre travail, seule, l'addition d'un homogénéisat de flagellés de même espèce et de souche différente provoque une certaine exaltation provisoire du pouvoir pathogène. Le mécanisme intime de l'acquisition d'un tel caractère demeure inexpliqué.

a. Cette exaltation se traduit par la possibilité d'implantation chez l'animal, sans que puisse être observées de lésions aussi sévères que celles habituellement décrites.

b. A notre avis, au cours de leur passage chez l'animal, les flagellés de la souche S_8 peuvent présenter, au sein des abcès à formes latentes, des formes de survie ou de résistance révélées par la culture ultérieure de ces abcès.

D - Le séjour chez l'animal n'est pas une condition suffisante pour obtenir l'exaltation durable du pouvoir pathogène, comme le prouvent les résultats de réinoculation effectués à partir des abcès à formes latentes.

CHAPITRE VII

Etude expérimentale et expression du pouvoir pathogène des Souches S_{I2} et S_{I4} .

Dans les pages précédentes, nous avons déjà signalé la possibilité nouvellement apparue d'infester directement la souris non préparée avec 250.000 flagellés appartenant cependant à des souches (S_{I2} et S_{I4}) normales.

Or, nous avons précisé, dans le chapitre II, que ce contingent de 250.000 cellules avait été choisi justement parce qu'il paraissait représenter une dose infestante incapable de permettre une prolifération des parasites, donc de déterminer des lésions chez les souris infestées.

En conséquence, l'expression du pouvoir pathogène sous la simple forme du rapport du nombre d'animaux porteurs de lésions au nombre total d'animaux dans le lot traité perdait, après cela, de la rigueur; nous avons alors mis au point un nouveau mode d'expression que nous proposons d'appeler l'indice moyen d'infes-

tation (I.M.I.) qui, à notre avis, rend plus exactement compte du pouvoir pathogène des souches expérimentées.

Aussi rassemblons nous, dans ce chapitre, les résultats que nous avons observés en inoculant régulièrement 250.000 flagellés de souches normales, à des souris neuves et ceux que nous obtenons en reprenant des expériences anciennes et en exprimant, cette fois de façon plus précise à l'aide de l'I.M.I., leurs effets pathogènes.

Nous étudierons de la même façon les effets de l'endoparasitisme des souches S_{12} et S_{14} , selon diverses modalités affectant la préparation des animaux ou les souches elles-mêmes.

I. Matériel et méthodes

A - Souris

Nous utilisons des souris femelles Swiss Webster CF, âgées de 4 à 5 semaines et pesant 16 à 18 grammes.

B - Cages

Nous disposons de 2 modèles de cages:
le premier pour 10 animaux, de 25 cm X 14 cm soit 350 cm².
le second pour 20 animaux, de 35 cm X 21 cm soit 735 cm².

C - Traitement des souches S_{12} et S_{14} par addition d'un homogénéisat de Trichomonas vaginalis de la souche S_{12} pathogène.

Nous réalisons, à 48 heures d'intervalle, 7 repiquages successifs de flagellés des souches S_{12} et S_{14} normales.

Au moment de chaque repiquage, nous ajoutons à chaque tube 1 ml de suspension de matériel cellulaire provenant du broyage mécanique, à l'aide de billes de verre, d'une suspension d'environ 150.10^6 flagellés par ml appartenant à la souche S_{I2} .

L'efficacité du broyage est vérifiée par un examen microscopique soigneux et par plusieurs cultures de la suspension obtenue, maintenues à 37°C. pendant 15 jours. Dans ces conditions, aucun développement n'a été observé dans les tubes de contrôle. La suspension est répartie, aussitôt après son obtention, à raison de 2 ml dans des tubes à hémolyse stériles qui sont ensuite immédiatement congelés à - 20°C.

Le tube, au moment de l'utilisation, est mis au bain-marie et ne sert qu'une fois.

Ultérieurement les repiquages sont régulièrement poursuivis dans du milieu de Magara auquel aucun homogénéisat n'est alors ajouté.

Au moment de l'emploi, les flagellés sont centrifugés à vitesse réduite (2000 t. par Min.), lavés une fois dans du soluté isotonique de glucose, repris dans ce même milieu et soigneusement comptés à l'hématimètre de Malassez.

On effectue alors la dilution nécessaire pour disposer du nombre de flagellés désiré dans 0,5 ml de suspension. On injecte le plus rapidement possible.

Cette façon d'opérer, au moment de l'injection, est toujours identique, quelles que soient les opérations antérieures effectuées.

D - Addition extemporanée de l'homoqénéisat de la souche S₁₂ pathogène à une souche S₁₂ normale vivante.

Au lieu d'être repris par une solution isotonique de glucose, les flagellés sont repris, après centrifugation et lavage, par la même suspension que ci-dessus et on opère, avec elle, les dilutions nécessaires.

E - Addition extemporanée d'une suspension de la souche S₁₂ pathogène tuée par chauffage.

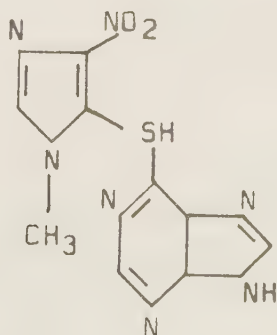
Les flagellés sont chauffés à 60°C pendant 1 h 30.

On procède ensuite à un examen microscopique et des ensemencements de contrôle qui sont gardés 15 jours à 37°C. Ils se révèlent négatifs.

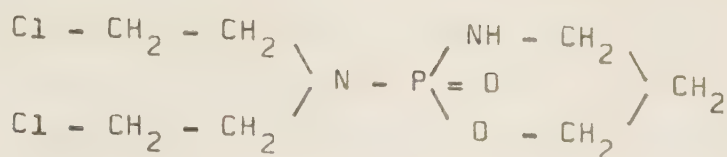
Le 0,5 ml injecté contient 250.000 flagellés vivants de la souche S₁₂ normale et de l'ordre de 10^7 Trichomonas pathogènes tués par chauffage.

F - Immunodépresseurs.

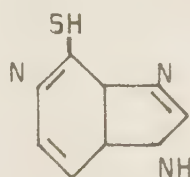
Nous avons utilisé dans cette famille de médicaments - l'azathioprine (Imurel*) ou (méthyl 1 - nitro - 4 imidazolyl - 5 thio) - 6 purine.



- la cyclophosphamide (Endoxan*) ou N,N-bis (β-chloréthyl)-N',O propylène phosphoramide.



- la mercapto - 6 purine (Purinéthol*)



1. Première série d'essais

Un premier lot de 20 souris a été traité par voie buccale, par l'azathioprine, à raison de 10 mg par Kg par jour pendant 7 jours.

Un deuxième lot de 20 souris est traité par la cyclophosphamide dans les mêmes conditions.

Les deux lots sont infestés par la souche S₁₂ normale le quatrième jour, c'est-à-dire au milieu de la période de traitement.

2. Deuxième série d'essais

Un premier lot de 20 souris est traité, par voie buccale, par l'azathioprine à raison de 20 mg par kg par jour pendant trois jours.

Un deuxième lot et un troisième lot de 20 souris sont traitées, dans les mêmes conditions, par la cyclophosphamide pour l'un, la mercaptopurine pour l'autre.

L'infestation par la souche S₁₂ normale est pratiquée le quatrième jour pour les 3 lots, soit 24 heures après la fin du traitement.

G - Agar

Sa molécule peut être représentée comme une chaîne de résidus de D galactose alternés avec des résidus de 3 - 6 - anhydro - L - galactose avec un demi - ester sulfate toutes les 10 unités de galactose.

1. Utilisation extemporanée in vivo.

Les flagellés des souches S₁₂ et S₁₄ normales sont centrifugés , à vitesse réduite, lavés et repris par un volume convenable de soluté isotonique de glucose contenant 0,10 g pour 100 d'agar afin d'obtenir 250.000 flagellés dans 0,5 ml.

La suspension cellulaire est immédiatement injectée après agitation soigneuse.

2. Traitement des souches in vitro.

On réalise, à 48 heures d'intervalle, 11 puis 23 repiquages successifs des flagellés des souches S₁₂ et S₁₄ normales.

Au moment de chaque repiquage, nous ajoutons 0,5 ml de soluté isotonique de glucose contenant 0,10 g pour 100 d'agar en faisant s'écouler lentement cette solution dans le fond du tube à l'aide d'une pipette Pasteur.

Il est important de signaler que le milieu reste parfaitement fluide.

Lorsqu'il est décidé d'utiliser les flagellés, le repiquage qui précède l'injection à la souris est pratiqué sur un milieu dépourvu d'agar.

Les flagellés, une fois centrifugés, lavés, repris par du soluté isotonique de glucose, peuvent être injectés à des souris neuves. On est ainsi assuré qu'il n'y a pas d'agar dans l'inoculum

et que les phénomènes consécutifs à l'infestation ne pourront être imputés qu'aux seuls flagellés et non à la présence du polysaccharide.

H - Détermination de l'indice moyen d'infestation (I.M.I.)

Il consiste à apprécier par une "note" donnée à chaque souris, l'importance de l'infestation au niveau des différents critères suivants:

- lésions hépatiques .
- lésions pancréatiques.
- abcès péritonéaux .
- liquide d'ascite.

Chaque critère est noté suivant son importance, de 0 à 4.

Un I.M.I. de 16 est donc attribué à l'animal présentant les signes maximums d'infestation.

Chaque animal ayant fait l'objet de ses 4 estimations individuelles, on additionne l'ensemble des notations attribuées aux animaux d'un même lot et le total obtenu est divisé par le nombre total d'animaux. On obtient ainsi un nombre, allant de 0 à 16, qui représente l'indice moyen d'infestation.

D'autre part, l'observation macroscopique de chaque foyer d'infestation est complétée par un examen microscopique. Lorsque ce dernier ne révèle pas de trophozoïte mobile, le foyer est estimé à la moitié de la note qui lui a été attribué pour son importance.

Prenons à titre d'exemple le cas présenté par un lot de 5 souris; il est noté ainsi:

animal n°1 = foie = 2, pancréas = 1, péritoine = 1	4
animal n°2 = négatif	0
animal n°3 = Ascite = 1, pancréas = 1	2
animal n°4 = foie = 1/2, pancréas = 1/2	1
animal n°5 = pancréas = 2/2	1

Total des points = 8

$$\text{I.M.I.} = \frac{8}{5} = 1,6$$

Cette série aura donc les caractéristiques chiffrées suivantes :

$$\begin{array}{c} 4^+ / 5 \\ 1,6 \end{array} : \text{puisque 4 animaux sur 5 sont trouvés porteurs de lésions} \\ = \text{valeur de l'I.M.I.}$$

En écrivant, le cas échéant, la note divisée par 2 (ex. foie = 1/2) on peut facilement repérer au sein d'un même lot le nombre de souris porteuses de foyers d'infestation à forme de résistance.

Dans ce cas, on peut compléter les caractéristiques chiffrées d'un lot de souris en faisant figurer sous le chiffre des animaux porteurs de lésions celui des animaux chez lesquels il a été impossible de déceler des trophozoïtes mobiles à l'examen microscopique. Pour l'exemple que nous avons donné, on peut alors écrire :

$$\begin{array}{c} \frac{4^+}{2} / 5 \\ 1,6 \end{array}$$

Lorsque l'examen microscopique ne permet pas de déceler de trophozoïte mobile, nous mettons en culture la partie examinée entre lame et lamelle et uniquement celle-là, afin d'éviter le plus possible l'ensemencement d'une forme mobile éventuellement présente dans un fragment de tissu non contrôlé microscopiquement.

II. Résultats

Nous avons rassemblé dans le tableau 21 les résultats obtenus à partir de lots d'animaux non traités et ayant reçu 250.000 flagellés des souches S_{12} et S_{14} normales.

A l'examen de ce tableau, on remarque l'importance de l'I.M.I. chez des animaux enfermés par groupes de 15 dans des cages conçues pour en abriter 10.

C'est donc pour mieux apprécier l'influence de la densité de la population contenue dans une cage sur le degré d'infestation que nous avons encore lancé 2 lots de 20 souris dont chacun est hébergé, pour la circonstance, dans une cage prévue pour 10 animaux. Les souris ainsi groupées montrent un comportement nerveux et inquiet. Leur I.M.I., par rapport à celui d'animaux installés plus au large, est sensiblement plus fort.

C'est ainsi que, chez 30 animaux, répartis en 3 cages de 10 on calcule un I.M.I. de :

- 0,17 pour la souche S_{12} ;
- 0,03 pour la souche S_{14} .

Chez 35 animaux traités dans les mêmes conditions par les mêmes souches, mais rassemblés en 2 cages de 10, on constate que l'I.M.I. est de :

- 0,46 pour la souche S_{12} ;
- 0,65 pour la souche S_{14} .

Pour le calcul de notre I.M.I. moyen, nous avons fait intervenir, en plus des 3 lots de 10 souris, le lot à 15 souris, ce qui nous donne :

- 0,30 pour la souche S_{12} ;
- 0,25 pour la souche S_{14} .

Tableau 21

250.000 flagellés de la souche S ₁₂ normale injectée à des souris neuves					
nbre an. inf.	I.M.I.	nbre an. inf.	I.M.I.	nbre an. inf.	I.M.I. MOYEN
0 / 10	0				
2 ⁺ / 10	0,40	4 ⁺ / 15	0,50	3 ⁺ / 30	0,17
1 ⁺ / 10	0,10	5 ⁺ / 20	0,40	4 ⁺ / 15	0,50
3 ⁺ / 30	0,17	9 ⁺ / 35	0,46	7 ⁺ / 45	0,28 ~~≠~~ 0,30
250.000 flagellés de la souche S ₁₄ normale injectés à des souris neuves					
nbre an. inf.	I.M.I.	nbre an. inf.	I.M.I.	nbre an. inf.	I.M.I. MOYEN
2 ⁺ / 10	0,10				
0 / 10	0	4 ⁺ / 15	0,65	2 ⁺ / 30	0,03
0 / 10	0	8 ⁺ / 20	0,65	4 ⁺ / 15	0,65
2 ⁺ / 30	0,03	12 ⁺ / 35	0,65	6 ⁺ / 45	0,24 ~~≠~~ 0,25

Dans le tableau 22 on peut se rendre compte de l'efficacité du traitement des souris par les hématies d'embryon de Poulet; respectivement $1,5.10^6$ et 6.10^6 .

A noter que ces résultats ont été obtenus une vingtaine de mois après les essais préliminaires effectués à partir des mêmes souches (essais rapportés au chapitre II).

Tableau 22

Souche	nbre T.V.	nbre H.E.P.	nbre an. inf.	I.M.I.
S ₁₂ normale	250.000	$1,5.10^6$	4 ⁺ / 10	0,90
S ₁₂ normale	250.000	6.10^6	4 ⁺ / 10	1,20

Ces résultats groupés dans le tableau 23 permettent de comparer les I.M.I. résultant de souris traitées selon INOKI mais infestées, les unes avec des flagellés de la souche S₁₂ normale et les autres avec des flagellés de la souche S₁₂ pathogène.

Tableau 23

Souche	nbre T.V.	nbre H.E.P.	nbre an. inf.	I.M.I.
S ₁₂ normale	500.000	6.10^6	10 ⁺ / 35	1,9
S ₁₂ patho.	500.000	6.10^6	11 ⁺ / 15	5,7

Le tableau 24 rassemble les résultats observés dans des lots d'animaux infestés par des flagellés prélevés chez des souris traités selon INOKI, chaque lot étant inoculé par les flagellés provenant du lot précédent. On étudie ainsi l'influence du passage d'animal à animal sur le pouvoir pathogène des flagellés.

Dans le lot 4, on trouve deux souris très infestées; l'une d'entre elles présente une ascite abondante contenant de très nombreux trophozoïtes mobiles. Cette ascite est diluée dans du soluté isotonique de glucose afin de disposer de 250.000 flagellés dans 0,5 ml. C'est cette préparation qui est inoculée aux animaux du lot 5.

Pour comparaison, le dernier lot en bas du tableau a été traité avec des flagellés de la souche S_{12} normale mis en suspension dans de l'ascite humaine.

Les résultats obtenus avec les flagellés des souches S_{12} et S_{14} normales traitées par un homogénéisat de la souche S_{12} pathogène figurent dans le tableau 25.

De plus, la première ligne de ce tableau permet d'apprécier l'action de cet homogénéisat quand il est ajouté extemporanément à la souche S_{12} normale.

Rappelons que des essais identiques ont été également pratiqués sur la souche S_8 (voir Chapitre III).

Tableau 24

Lot	nbre T.V.	Conditions	nbre an. inf.	I.M.I.
1	500.000	$6 \cdot 10^6$ H.E.P. S_{12} normaux ↓	$6^+ / 10$	1,9
2	350.000	S_{12} patho. ↓	$5^+ / 10$	3,4
3	250.000	S_{12} patho. ↓	$2^+ / 10$	1,5
4	250.000	S_{12} patho. ↓	$2^+ / 10$	1,8
5	250.000	S_{12} patho. dans leur ascite.	$9^+ / 10$	6,2
	250.000	S_{12} normaux avec ascite humaine.	$11^+ / 20$	0,85

Tableau 25

Traitement des souches S₁₂ et S₁₄ normales par des flagellés de la souche S₁₂ pathogène après homogénéisation de celle-ci et contrôle de l'absence de trophozoïtes vivants.

Nombre de flagellés injectés lors de toutes les expérimentations = 250.000			
Souche	Conditions	Nombre an. inf.	I.M.I.
S ₁₂	S ₁₂ virulents homogénéisés ajouté extemp. lors de l'injection	11 ⁺ / 20	1
S ₁₂	7 ^e Traitement comportant en plus S ₁₂ vir. homogénéisés et m. de culture lors de l'injection	3 ⁺ / 6	1
S ₁₄	"	5 ⁺ / 6	1,70
S ₁₂	7 traitements - 1 ^{er} repiquage	4 ⁺ / 10	1,30
S ₁₄	"	3 ⁺ / 10	0,70
S ₁₂	7 traitements - 3 ^e repiquage	3 ⁺ / 10	0,90
S ₁₄	"	4 ⁺ / 10	0,70
S ₁₂	7 traitements - 5 ^e repiquage	8 ⁺ / 10	1,80
S ₁₄	"	10 ⁺ / 10	2,60
S ₁₂	7 Traitements - 8 ^e repiquage	5 ⁺ / 10	1,70
S ₁₄	"	2 ⁺ / 10	0,60
S ₁₂	7 Traitements - 9 ^e repiquage	5 ⁺ / 10	1,20
S ₁₄	"	3 ⁺ / 10	0,50

Le contenu du tableau 26 permet d'apprécier l'action de flagellés pathogènes tués par chauffage et ajoutés extemporanément à la souche S_{12} normale.

On pourra également lire les résultats obtenus après réinoculation des flagellés retirés des animaux ayant subi cette première infestation.

Tableau 26

Souche	nbre T.V.	nbre an. inf.	I.M.I.
S_{12} normale	250.000	7 ⁺ / 9	2,80
Réinjection des S_{12}	250.000	2 ⁺ / 10	0,50

Le tableau 27 rassemble les résultats des expériences effectuées pour mesurer l'action des immunodépresseurs. L'influence des immunodépresseurs a été étudiée dans 2 séries d'épreuves distinctes.

Nous essayons d'abord l'azathioprine et la cyclophosphamide administrées pendant 7 jours consécutifs avec infestation en cours de traitement en espérant ainsi obtenir des animaux porteurs d'un I.M.I. important.

Comme on peut s'en apercevoir, les résultats obtenus sont décevants. C'est pourquoi nous passons à un autre protocole opéra-

toire : administration des immunodépresseurs pendant 3 jours consécutifs, en doublant les doses et infestation des animaux le quatrième jour.

Dans cette série, nous essayons également la mercapto-6-purine, en plus des 2 immunodépresseurs déjà utilisés.

Tableau 27

250.000 flagellés de la souche S ₁₂ normale injectés à des souris traitées			
Immunodépresseur	Conditions	nbre an. inf.	I.M.I.
Azathioprine	10 mg/kg/j/7 j.	4 ⁺ / 20	0,35
Cyclophosphamide	infestation le 4 ^e jour.	6 ⁺ / 20	0,40
Azathioprine	20 mg/kg/j/ 3 j.	16 ⁺ / 20	1,45
Cyclophosphamide	infestation 24 heures après la dernière ingestion	17 ⁺ / 20	1,70
Mercaptopurine		9 ⁺ / 20	1

L'action de l'agar sur le pouvoir pathogène des souches S₁₂ et S₁₄ est rapportée :

- dans le tableau 28, où sont consignés les résultats obtenus par action conjuguée de l'agar et des flagellés chez la Souris ;

- dans le tableau 29 où sont rapportées les observations faites après inoculation des flagellés cultivés en présence du polysaccharide.

Tableau 28

Addition extemporanée in vivo de glucose-agar à 0,10 p. cent			
Souche	nbre T.V.	nbre an. inf.	I.M.I.
S ₁₂ normale	250.000	13 ⁺ / 20	1,80
S ₁₄ normale	250.000	9 ⁺ / 15	1,55

Tableau 29

Trichomonas traités in vitro par du glucose-agar à 0,10 p. cent				
Souche	nbre T.V.	Conditions	nbre an. inf.	I.M.I.
S ₁₂ traitée	250.000	11 traitements 1 repiquage	14 ⁺ / 20	1,90 [*]
S ₁₄ traitée	250.000	"	1 ⁺ / 20	0,50
S ₁₂ traitée	250.000	23 traitements 1 repiquage	10 ⁺ / 20	1,30
S ₁₄ traitée	250.000	"	7 ⁺ / 18	1,70
* Réinjection	250.000		7 ⁺ / 10	1,60

En plus de ces résultats chiffrés, il nous semble intéressant de rapporter en détail les phénomènes que nous pouvons observer quand on met en contact Trichomonas vaginalis avec de l'agar dans les conditions que nous avons définies plus haut (Matériel et méthodes G 2.).

Si nous observons, au bout des 24 premières heures d'incubation, une culture de Trichomonas vaginalis où de l'agar a été ajouté au moment de l'ensemencement, nous constatons que le contenu du tube, au lieu d'être uniformément louche, comme il est habituel, présente, dans son tiers inférieur, un dépôt floconneux alors que le contenu du tube témoin, contenant le milieu de culture et la même quantité d'agar mais où aucun flagellé n'a été introduit, reste parfaitement et complètement clair.

La culture, examinée au microscope, montre au faible grossissement (x 250) de grandes plages où de nombreux flagellés restent immobiles et pourraient paraître morts.

Toutefois, un examen pratiqué à une plus forte combinaison (x 1000) et au contraste de phase révèle un comportement fort différent.

Les flagellés, loin d'être immobiles, sont animés sur place d'une activité tout à fait inhabituelle dont nous allons essayer de rendre compte.

Au début du processus, les flagellés sont entièrement enfermés comme dans un sac et, à l'aide de leurs flagelles et de la poussée de leur cytoplasme, en éprouvent successivement, en tournant sur eux-mêmes, tous les points de la paroi pour tenter de pratiquer une ouverture (voir figure 4, p. 166).

Lorsque les flagelles ont pu être dégagés, la lente extraction du trophozoïte commence, exigeant des efforts considé-

rables. Ceux-ci se manifestent par des mouvements qui paraissent coordonnés et qui sont, en tout cas, fort différents des mouvements des flagellés évoluant dans un milieu normal où la locomotion s'effectue au hasard et de façon désordonnée.

Chacun des 4 flagelles libres est lancé en avant et tente de s'accrocher à tout support rencontré sur la lame. S'ils trouvent un appui ils essaient par un effort de traction, de dégager lentement le corps cellulaire dont la partie postérieure semble retenue. Les mouvements de ces flagelles sont indépendants les uns des autres.

La membrane ondulante par ses mouvements aide, sans doute aussi, au dégagement, tout au moins pour le tiers antérieur.

Le cytoplasme, par des ondulations observables en deçà et au delà de l'ouverture pratiquée, semble distendre lentement l'ancienne membrane qui l'entoure.

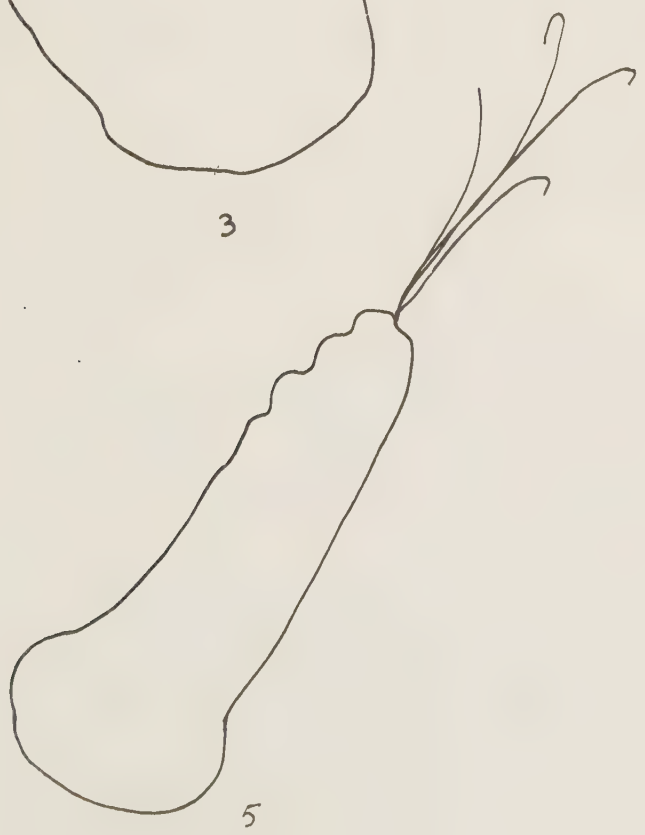
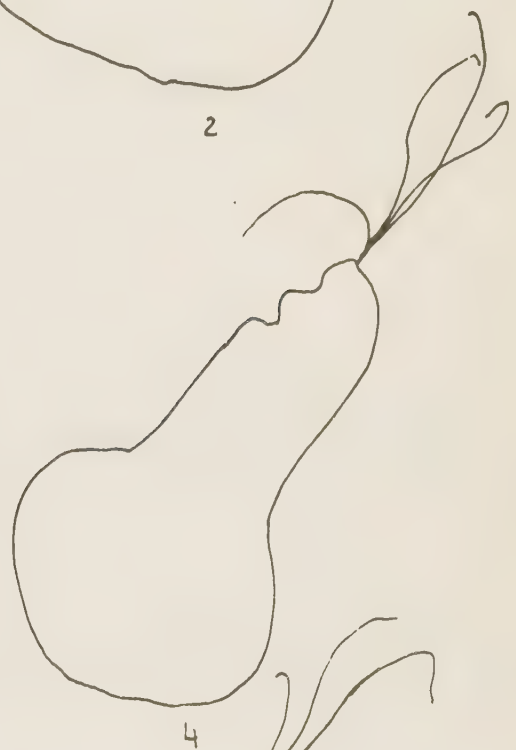
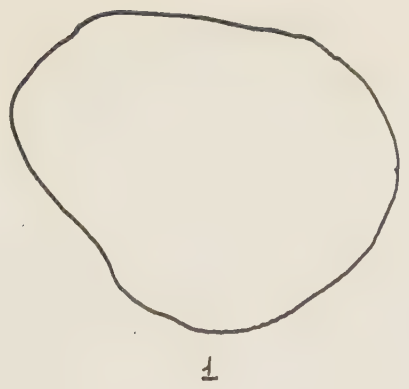
Celle - ci se craquèle, formant de petits fragments bien visibles en arrière de la partie nouvellement sortie qui, elle, paraît lisse.

L'ensemble prend maintenant une forme de jeune champignon; les mouvements du cytoplasme et des flagelles sont toujours très énergiques et coordonnés, en vue d'une extraction complète.

Certains flagellés ne parviennent pas au terme de leurs efforts et meurent au cours de leur tentative. Les autres poursuivent leur entreprise. De temps en temps, les flagelles battent vers l'arrière et, grâce à des mouvements extrêmement rapides, semblent essayer de détacher des fragments de l'ancienne membrane.

Enfin, le flagellé dont la forme redevient normale, peut retrouver la liberté de ses mouvements et achever de se libérer des particules qui le couvrent encore ou qu'il traîne derrière lui.

Figure 4



On retrouve ces particules, très nombreuses dans le milieu, sur la préparation, sous la forme de grands agglomérats grisâtres.

Un nouveau Trichomonas transformé avec, semble-t-il, une nouvelle membrane cellulaire, apparaît sous une morphologie tout à fait semblable à celle qu'il aurait présentées'il avait vécu dans un milieu dépourvu d'agar mais doué d'un caractère fondamentalement différent: son pouvoir pathogène se trouve considérablement augmenté.

III. Discussion.

Le tableau 2I p.156, montre que nous avons établi notre I.M.I. moyen sur 45 souris pour les souches S_{I2} et S_{I4} normales en conservant donc, dans son calcul, les lots à 15 souris, ceci pour garder une bonne marge de sécurité.

L'I.M.I. moyen est donc, toutes choses égales par ailleurs, de 0,30 pour la souche S_{I2} normale et de 0,25 pour la souche S_{I4} normale.

Or, un inoculum de 250.000 flagellés devait nous fournir un I.M.I. égal à zéro comme nous l'avons vu dans le chapitre II.

Les résultats que nous rapportons ici, semblent donc s'inscrire en faux par rapport à nos prévisions.

A cela, nous proposons deux explications:

- l'utilisation de souris Swiss Webster de 4 - 5 semaines à la place de souris blanches courantes de 5 - 6 semaines, nous a fait travailler sur des animaux un peu plus jeunes et, peut-être, plus sensibles;

- notre tendance, au cours de ce travail, à raccourcir les temps de culture lorsque les flagellés sont destinés à l'injection (maintenant de 30 à 35 heures) nous permet d'inoculer une population de flagellés très vigoureux et pratiquement sans morts.

Quoiqu'il en soit, l'interprétation rigoureuse des résultats observés exige, pour éviter tout travail hasardeux, de lancer régulièrement des lots témoins de 250.000 flagellés de la souche étudiée à des souris neuves en même temps que les expériences mises en oeuvre.

Il semble, d'autre part, que la densité de population dans une cage ait un léger effet sur l'infestation des animaux. L'étude de cet effet de groupe, pour intéressante qu'elle soit, ne nous a pas retenu davantage.

Dans le tableau 22 p. 157, nous comparons les effets de l'injection de $1,5 \cdot 10^6$ et de $6 \cdot 10^6$ hématies d'embryon de Poulet.

L'I.M.I. est légèrement supérieur chez les animaux préparés avec $6 \cdot 10^6$, bien que le nombre d'animaux utilisés ne nous permette pas d'être catégorique. De toute manière, il faut tenir compte de la capacité de résistance de chaque animal à l'invasion de cellules étrangères et à l'importance du blocage que ces dernières exercent sur les mécanismes de défense.

Dans le tableau 23 p. 157, nous observons que les I.M.I. de la souche S_{I2} normale (1,9) et de la souche S_{I2} pathogène (5,7) diffèrent entre eux dans le rapport de 1 à 3. Cet écart nous paraît logique. A ce propos, remarquons que l'I.M.I. de la souche S_{I2}

normale varie de 1 à 3 ou 4, suivant que l'animal infesté est préparé avec des hématies de poulet ou non (tableau 21 et 22).

Le tableau 24 p.159, nous indique que l'I.M.I. de la souche S_{I_2} pathogène (lots 3 et 4) est situé entre 1,60 et 1,70. Le lot 2 possède un I.M.I. anormalement élevé, que n'explique pas complètement l'inoculum de 350.000 flagellés au lieu de 250.000 comme il est habituel.

Le lot 5 est remarquable par l'I.M.I. proportionnellement très élevé (6,2). Ce résultat vient confirmer une impression que nous avons, selon laquelle une ascite, contenant des trophozoïtes mobiles, représentait un matériel hautement pathogène.

L'ascite humaine en revanche, en dépit de l'utilisation de flagellés S_{I_2} normaux, semble moins puissante puisque l'I.M.I. n'est que de 0,85.

Il nous reste à dégager, après les résultats que nous avons exposés et les discussions qu'ils ont suscitées, quelques notions permettant une expression plus objective du parasitisme.

Indice moyen d'infestation.

Il sera d'autant plus solidement établi, que le nombre des animaux mis en oeuvre sera plus grand.

Tout dépend et cela est fonction de l'objectif à atteindre, de la précision de l'I.M.I. que l'on désire obtenir.

Il est de toute façons très difficile de descendre en dessous de 10 animaux, surtout si l'expérience est isolée et ne fait pas partie d'un programme mettant en oeuvre une succession de lots, étalés régulièrement dans le temps. Dans ce cas, d'expérience isolée, un contingent de 20 animaux nous semble acceptable.

POUVOIR PATHOGENE INTRINSÈQUE (P.P.I.).

C'EST LE POUVOIR PATHOGÈNE EXPRIMÉ PAR L'I.M.I. QUE DEVELOPPE UN NOMBRE CONNU DE FLAGELLÉS D'UNE SOUCHE NORMALE NON TRAITÉE, DONT LA CULTURE EST D'ÂGE CONNU, INJECTÉE CHEZ DES SOURIS DE RACE PURE, NON TRAITÉES ET D'ÂGE CONNU.

Pour 250.000 parasites des souches S_{I2} et S_{I4} il est respectivement de 0,30 et de 0,25.

L'âge de la culture recouvre 2 notions:

- l'âge depuis la mise en culture
- l'âge de la culture depuis le dernier repiquage.

POUVOIR PATHOGENE INTRINSÈQUE MINIMUM (P.P.I.M.).

C'EST LE POUVOIR PATHOGÈNE QUE DEVELOPPE LE NOMBRE MINIMUM DE FLAGELLÉS D'UNE SOUCHE NORMALE, NON TRAITÉE, DONT LA CULTURE EST D'ÂGE CONNU, ET QUI SE TRADUIT CHEZ DES SOURIS DE RACE PURE, NON TRAITÉES, D'ÂGE CONNU, PAR UN I.M.I. LÉGÈREMENT SUPÉRIEUR À ZÉRO.

En ce qui concerne ce nombre de 250.000, choisi depuis longtemps pour les souches S_{I2} et S_{I4} , il était destiné à l'origine à donner des souris négatives dans tous les cas. Puis les conditions ont changé (souris de race pure et un peu plus jeunes; cultures de 30 à 35 heures) et 250.000 correspond maintenant pour les 2 souches à un P.P.I.M..

Notons qu'en ce nombre de 250.000 et pour les souches S_{I2} et S_{I4} P.P.I. et P.P.I.M. coïncident.

Pour la souche S₈ en revanche, 250.000 flagelles représentent une population très éloignée de celle qui serait capable de révéler un P.P.I.M.

Comme nous le verrons dans le prochain chapitre le P.P.I.M. de cette souche doit se situer entre 5.10^6 et $7,5.10^6$.

POUVOIR PATHOGÈNE SUPPLÉMENTAIRE (P.P.S.)

C'EST LE POUVOIR PATHOGÈNE D'UNE SOUCHE, DÉVELOPPÉ PAR LE NOMBRE DE FLAGELLÉS CORRESPONDANT AU P.P.I.M. DE CETTE MÊME SOUCHE, MAIS QUI SE TRADUIT PAR UN I.M.I. SUPÉRIEUR, CELA CHEZ DES SOURIS NEUVES, NON TRAITÉES, DE MÊME RACE ET DE MÊME ÂGE.

Le P.P.S. peut être conféré à une souche de différentes façons.

- soit par intervention directe sur Trichomonas vaginalis in vitro.
- soit par passage chez l'animal; l'acquisition du P.P.S. semble attachée aux trophozoïtes mobiles dans les lésions, au moment du sacrifice de l'animal. Nous avons vu à propos de la souche S₈, que les formes immobiles, dites de résistance, remises en culture et réinjectées, sont incapables d'acquérir un P.P.S.

L'infestation de l'animal peut elle-même être obtenue, de 2 façons différentes, avec une souche normale.

- soit en utilisant un nombre élevé de flagellés, chez des souris neuves,
- soit en mettant en oeuvre un nombre moins important chez des souris préparées.

Pour être certain de pouvoir estimer correctement un P.P.S. et vérifier ainsi l'efficacité de tel ou tel traitement, il faut au préalable fixer avec précision le P.P.I.M. de la souche utilisée.

Lorsqu'on veut éprouver un nouveau traitement susceptible de provoquer un P.P.S., le fait de ne pas mettre en oeuvre le nombre de flagellés correspondant au P.P.I.M., peut conduire à des déconvenues, si l'on a affaire, comme c'est le cas pour la souche S_8 , à des flagellés remarquablement peu agressifs.

Les résultats rapportés dans le chapitre III à propos de la souche S_8 , correspondent en fait, à l'acquisition par cette souche, d'un P.P.S.. Celui-ci s'est avéré assez transitoire et nous discuterons le caractère de cette acquisition, que nous avons supposé un moment être à support génétique. Nous verrons aussi qu'en reprenant le problème posé par cette souche, sur des bases plus correctes, nous commençons à obtenir des résultats qui semblent encourageants.

Le P.P.S. se traduit par un I.M.I. situé entre 1,5 et 1,8 pour des flagellés de la souche S_{12} ayant subi des passages sur l'animal, lavés après culture et injectés au sein de soluté isotonique de glucose.

La valeur de l'I.M.I. peut varier au gré de l'expérimentateur, en combinant 2 à 2 les facteurs suivants dont il dépend:

- souche à pouvoir pathogène intrinsèque.
- souche à pouvoir pathogène supplémentaire.
- souris neuve (S.N.).
- souris traitée (S.T.).

Prenons comme exemple les différentes possibilités offertes par la souche S_{12} .

En injectant toujours 250.000 flagellés nous obtenons les valeurs portées sur le tableau 30.

Tableau 30

SOUCHE S_{12}	:	SOURIS	:	I.M.I.
P.P.I.M.		Neuve		0,30
P.P.I.M.		Traitée H.E.P.		1
P.P.S.		Neuve		1,7
P.P.S.		Traitée H.E.P.		3

l'I.M.I. concernant la quatrième catégorie, a été calculé sur 5 animaux seulement ; à notre avis, ce résultat reste valable ; en effet, un autre lot de souris traité avec 500.000 flagellés de la même souche a donné (voir tableau 23, p. 157) :

- chez des souris traitées ayant reçu S_{12} /P.P.I. un I.M.I. = 1,9
- chez des souris traitées ayant reçu S_{12} /P.P.S. un I.M.I. = 5,7,

Soit une relation de 1 à 3, identique à celle que l'on peut calculer à partir des I.M.I. de la deuxième et de la quatrième lignes.

Des indications du tableau 30, nous pouvons donc déduire les relations suivantes entre les différents I.M.I., selon les conditions d'expérimentation,

TABLEAU 3I

si	P.P.I.M.	S.T. = I	P.P.S.	S.N. = 1,7	$\Delta = 0,7$ (1)
si	P.P.S.	S.N. = I	P.P.S.	S.T. = 1,8	$\Delta = 0,8$ (2)
si	P.P.I.M.	S.N. = I	P.P.I.M.	S.T. = 3,3	$\Delta = 2,3$ (3)
si	P.P.I.M.	S.T. = I	P.P.S.	S.T. = 3	$\Delta = 2$ (4)
si	P.P.I.M.	S.N. = I	P.P.S.	S.N. = 5,6	$\Delta = 4,6$ (5)
si	P.P.I.M.	S.N. = I	P.P.S.	S.T. = 10	$\Delta = 9$ (6)

En calculant les différences consignées dans le tableau précédent, nous avons cherché à mettre en évidence, la supériorité RELATIVE, des éléments de la deuxième colonne, par rapport à ceux qui lui correspondent dans la première.

Si nous considérons les différences (2) et (3), il apparaît que la supériorité RELATIVE du facteur "Souris Traitée" sur le facteur "Souris Neuve", est plus importante avec des souches à P.P.I.M.,

Puisque avec la souche à P.P.S. $P.P.S./S.T. - P.P.S./S.N. = 0,8$
 et avec la souche à P.P.I.M. $P.P.I.M./S.T. - P.P.I.M./S.N. = 2,3$

Si nous considérons les différences (4) et (5), il apparaît que la supériorité RELATIVE du facteur "P.P.S." sur le facteur "P.P.I.M.", est plus importante avec des souris neuves.

Puisque avec "Souris Traitée" $P.P.S./S.T. - P.P.I.M./S.T. = 2$
et avec "Souris Neuve" $P.P.S./S.N. - P.P.I.M./S.N. = 4,6$

Ainsi, il semble que la supériorité d'un facteur donné par rapport à celui qui lui correspond, s'accuse d'autant plus nettement, que le facteur complémentaire n'a fait l'objet d'aucun traitement.

Si nous considérons les termes de la différence (I) d'une part et ceux des différences (3) et (5) d'autre part, il apparaît qu'à chaque fois, le facteur "P.P.S." semble jouer un rôle plus important que le facteur "Souris Traitée".

Ces notions étant précisées, reprenons la discussion des tableaux de résultats.

Les homogénéisats obtenus avec la souche S_{I2} pathogène et ajoutés extemporanément lors de l'injection des flagellés de la souche S_{I2} normale (v. tableau 25 p. 160) doivent avoir un effet facilitant, puisque l'I.M.I. est égal à I alors que celui du P.P.I.M. est de 0,30. Cependant le nombre de lésions contenant des formes de résistance est très élevé.

Les autres I.M.I. sont la preuve d'une action incontestable du traitement in vitro, bien que l'on enregistre des variations importantes entre les différents lots.

Remarquons que les temps de traitement in vitro portent maintenant, sur une période de 2 semaines et qu'ils dureront jus-

qu'à 3 semaines avec l'utilisation de l'agar.

Ce délai de 3 semaines correspond à la durée d'incubation choisie chez l'animal. Il n'y a pas de raison en effet, que les traitements visant à l'acquisition d'un P.P.S. in vitro, soient plus courts que le temps de passage chez l'animal.

D'ailleurs nous pouvons sans doute attribuer à un temps de contact trop court, les résultats inconstants et décevants que nous exposons dans le chapitre II, à propos de l'utilisation de broyats de foie ou de pancréas, destinés à augmenter le pouvoir pathogène des souches S_{I2} et S_{I4} cultivées à leur contact.

Le but de la série d'expériences rapportées dans le tableau 25 p. 160, ainsi que de celles effectuées avec la souche S_8 (chapitre III) visait à réaliser une transformation génétique, se rapprochant de celle qui a déjà été réalisée avec les virus, en mettant en contact des souches normales avec des flagellés pathogènes broyés.

Les résultats diffèrent pour chacun des deux groupes d'expériences, sans doute à cause du fait que nous n'avons pas tenu compte du P.P.I.M. de la souche S_8 . Cependant, nous pouvons les considérer comme intéressants, bien qu'à notre avis cette transformation génétique ne se soit pas produite; en cela, nous sommes en contradiction avec HONIGBERG et READ (42) qui, effectuant le même type d'expériences avec Trichomonas gallinae, estiment probable que la virulence est un caractère génétiquement contrôlé.

Nos raisons sont les suivantes:

- les résultats fournis par la souche S_8 , du fait de l'utilisation de 250.000 flagellés, auraient du être beaucoup plus spectaculaires

si cette souche avait hérité des caractères de la souche S_{12} pathogène.

Dans les deux groupes d'expériences, le P.P.S. des souches S_8 et S_{12} traitées par un broyat de S_{12} pathogène, baisse trop rapidement au cours des repiquages successifs, pour que l'on puisse supposer que le matériel génétique soit intervenu dans l'acquisition de ce pouvoir pathogène. Notons qu'HONIGBERG (42) qui lui aussi a constaté l'augmentation du pouvoir pathogène, n'a pas suivi son évolution au cours de repiquages successifs.

En ce qui nous concerne, nous ne pensons pas que les phénomènes les plus importants se situent à ce niveau, mais à un autre, au départ peut être plus inattendu, celui de la membrane cellulaire; nous reparlerons de ce problème plus loin.

Les résultats du tableau 26 p.161, traduisent l'action de flagellés pathogènes de la souche S_{12} , tués par chauffage, qui facilite l'implantation de la souche S_{12} normale. L'I.M.I. obtenu (I.M.I. = 2,8) est important et meilleur que celui fourni par la suspension de flagellés broyés (I.M.I. = 1).

De plus, il est intéressant de constater qu'ici, le passage des flagellés chez la souris se soit soldé par une nette diminution de l'I.M.I. (I.M.I. = 0,50), ce qui semble indiquer qu'il n'y a presque pas eu acquisition d'un P.P.S. Le seul passage chez l'animal n'est pas toujours une condition suffisante à cette acquisition.

Tout semble se passer dans les expériences rapportées dans le tableau 26, comme si l'I.M.I. de 2,8 avait été obtenu, plus par l'intervention des flagellés pathogènes tués par

chauffage, sur les tissus de l'hôte, que par la présence de flagellés de la souche S₁₂ normale qui auraient simplement vu leur implantation favorisée par cette intervention.

Le tableau 27 p.162, résume l'action des immunodépresseurs; son examen appelle un commentaire à cause des différences remarquables, entre les I.M.I. de la première et de la deuxième série.

L'infestation de la souris au cours du traitement par l'immunodépresseur permet le contact de Trichomonas avec ce produit et il semble que celui-ci exerce un puissant effet inhibiteur:

- Soit sur sa capacité d'acquisition du P.P.S.; notons cependant que la cyclophosphamide n'est pas immunodépresseive;

- Soit sur les possibilités de multiplication du flagellé; en effet l'azathioprine, la cyclophosphamide et la mercaptopurine ont des propriétés cytostatiques.

En revanche, l'infestation de la souris après la fin du traitement par l'immunodépresseur fournit des I.M.I. beaucoup plus satisfaisants.

L'étude de ce phénomène devra être complétée par une autre épreuve, consistant dans le traitement in vitro de souches normales et pathogènes, de pouvoir pathogène connu, par des immunodépresseurs et le contrôle éventuel de l'abaissement des P.P.I. et P.P.S. après infestation de la souris.

Le tableau 28 p.163, contient les résultats qui expriment l'action de l'agar, lorsque celui-ci est ajouté juste avant l'injection à l'animal.

Les I.M.I. obtenus sont démonstratifs et prouvent que l'action de l'agar vaut celle des hématies d'embryon de Poulet. Cette action confirme les constatations qu'HONIGBERG (37) avait

Pour être prouvée, l'acquisition du P.P.S. doit se manifester par un I.M.I. supérieur à celui du P.P.I.M.. On doit alors trouver des trophozoïtes mobiles dans les lésions créées chez les souris infestées.

B - Pour les traitements in vitro, nous avons utilisé du matériel cellulaire homogénéisé ou de l'agar. Il est probable que d'autres cellules et d'autres substances pourraient être efficaces.

De son côté, le traitement de la souris n'a pas davantage un caractère de stricte spécificité. Il a pour but de diminuer pour un temps les défenses de l'animal et de permettre la multiplication de Trichomonas vaginalis.

Les possibilités de multiplication une fois assurées, les flagellés peuvent au contact des cellules étrangères, développer leur pouvoir pathogène.

En ces circonstances, la souris peut être assimilée à un milieu de culture modifié, rendu apte au développement de Trichomonas et capable de révéler le pouvoir pathogène du flagellé, par le développement de lésions, ce que ne saurait faire un tube de culture.

Quoi qu'il en soit, qu'il s'agisse d'un milieu de culture modifié ou de l'organisme animal, Trichomonas vaginalis trouve à la fois:

- les circonstances favorables à sa multiplication,
- le contact avec du matériel cellulaire étranger; deux facteurs essentiels au développement d'un pouvoir pathogène supplémentaire.

C - L'utilisation de substances chimiques définies, comme l'agar et les immunodépresseurs nous a permis des observations particulières:

C'est ainsi que l'agar est capable de provoquer un P.P.S., qu'il soit utilisé in vitro ou in vivo, dans le premier cas par une action directe sur le flagellé, dans le second par l'intermédiaire de la Souris.

En ce qui concerne l'action sur le flagellé, nous en avons décrit les manifestations objectives et nous pensons prolonger ce travail en nous servant d'autres types cellulaires, parasites ou non.

Quant aux immunodépresseurs, leur action est sans doute complexe, puisqu'en plus de l'action dépressive certaine sur les mécanismes de défense de la Souris, ils semblent capables d'agir au niveau du parasite en diminuant ses possibilités de multiplication ou en altérant ses propriétés d'adaptation à l'agression.

On peut donc envisager la possibilité de disposer un jour d'une série de substances, capables d'augmenter ou de diminuer le pouvoir pathogène de Trichomonas vaginalis. Il sera ainsi possible d'étudier, de plus en plus finement, les facteurs internes qui assurent au flagellé l'étonnante plasticité dont il a fait preuve au cours de nos expériences.

Enfin il sera peut être possible de transposer à d'autres protozoaires parasites, les observations faites sur Trichomonas vaginalis; la connaissance précise de la nature de ces phénomènes permettra sans doute la mise au point de thérapeutiques, non plus empiriques, mais particulièrement adaptées au comportement biologique et métabolique des parasites qu'elles devront combattre.

CHAPITRE VIII

Nouveaux essais d'acquisition d'un pouvoir pathogène supplémentaire par la souche S₈.

Au cours de nos expériences précédentes, l'exaltation du caractère agressif de la souche S₈, qui avait pu être obtenu était faible et provisoire. Dans la plupart des lésions observées, les flagellés avaient pris des formes de résistance qui, mises en culture, avaient fourni une population florissante mais dont le pouvoir pathogène n'avait pas augmenté.

L'explication de ce phénomène réside dans le fait que la dose infestante avait été trop faible et donc très éloignée du P.P.I.M. Les traitements in vitro, malgré leur efficacité constatée sur les autres souches, n'avaient pu que combler partiellement ce déficit. Au lieu d'être immédiatement détruits, les flagellés traités, à défaut de proliférer, semblaient se protéger en engendrant des formes de résistance.

Nous envisageons de reprendre le problème que pose l'état réfractaire de la souche S₈ en réalisant le programme suivant :

- nous allons augmenter les doses infestantes jusqu'à obtenir

l'infestation de la Souris, ce qui nous permettra de définir le pouvoir pathogène intrinsèque. A partir de là, nous essaierons, à condition de trouver des trophozoïtes mobiles dans les lésions, de passer la souche d'animal à animal pour lui faire acquérir un pouvoir pathogène supplémentaire de plus en plus important.

Lors de la première réinoculation à un animal neuf, nous observerons si la longueur du temps de séjour chez l'animal est un facteur d'augmentation du P.P.S.

D'autre part, en nous fondant sur les résultats obtenus avec les souches S_{12} et S_{14} , nous commençons à repiquer la souche en présence d'agar pour pouvoir l'éprouver ainsi traitée.

Le but de ces opérations est naturellement de restaurer le pouvoir pathogène de cette souche, florissante en culture et morphologiquement tout à fait semblable aux autres, au niveau de celui des souches S_{12} , S_{13} et S_{14} plus jeunes.

I. Matériel et méthodes

- Souris de race pure Swiss Webster CF_1 , de 4 à 5 semaines, pesant de 16 à 18 grammes.
- Souche S_8 cultivée en milieu de Magara normal.
- Souche S_8 cultivée en milieu de Magara additionné d'agar.

Avec la souche conservée sur milieu de Magara normal, nous injectons aux animaux des doses infestantes progressives allant de $1,25.10^5$ à 12.10^6 flagellés.

Avec la souche conservée sur milieu de Magara additionné d'agar, nous avons utilisé une dose infestante unique de 10^6 flagellés ayant subi 27 repiquages successifs dans le milieu en question.

II. Résultats

A - Le tableau 32 regroupe tous les résultats obtenus chez des souris neuves, depuis l'origine de ce travail, avec la souche S_8 , non traitée, ainsi que ceux obtenus à l'occasion de ces essais.

Tableau 32

Souche S_8 non traitée - Animaux neufs		
Nombre de T.V.	Nombre d'animaux infestés	I.M.I.
$1,25 \cdot 10^5$	0 / 10	0
$2,5 \cdot 10^5$	0 / 30	0
$5 \cdot 10^5$	0 / 16	0
$1 \cdot 10^6$	0 / 12	0
$2 \cdot 10^6$	0 / 10	0
$3,2 \cdot 10^6$	$\frac{1^+}{1} / 5$	*
$5 \cdot 10^6$	0 / 10	0
$7,5 \cdot 10^6$	$3^+ / 10$	1,3
$12 \cdot 10^6$	$14^+ / 14$	6 * *

* I.M.I. difficile à établir : obtention d'une toute petite lésion à formes latentes ; 5 souris utilisées seulement.

* *

I.M.I. difficile à établir : les souris meurent avant une attaque caractérisée des organes.

Ainsi, pour une dose infestante de $7,5.10^6$, nous retrouvons les flagellés de la souche S_8 après injection chez des souris neuves. Sur les 10 souris de ce lot, l'une d'entre elles est trouvée morte au bout de 8 jours.

Son I.M.I. est alors égal à 5 avec une ascite égale à 3. Une autre est tuée ce même jour. Son I.M.I. est de 6 avec une ascite estimée à 3 ; la troisième est tuée au bout de 15 jours, son I.M.I. est de 2 et elle porte un abcès péritonéal ; 7 souris enfin sont complètement négatives.

Avec 12.10^6 flagellés, le volume de l'inoculum est de 1 ml, ce qui a eu peut-être une influence sur les résultats qui s'avèrent très favorables ; toutes les souris sont positives et nous sommes obligés, vu leur état, de les sacrifier le cinquième et le septième jour. L'I.M.I. est difficile à déterminer. L'ascite est très importante (3 à 4 ml) et elle contient de 80 à 100.10^6 parasites par ml.

Nous sommes donc en présence d'une véritable culture de flagellés dans laquelle baignent les organes abdominaux. Cependant, la présence du flagellé n'y est visible qu'en surface et donc l'intensité du parasitisme ne se traduit pas au niveau de l'importance des lésions.

B - Dans le tableau 33, nous avons regroupé les résultats obtenus avec la souche S_8 , non traitée, utilisée chez des animaux préparés aux H. E. P.

C - Le tableau 34 comporte les résultats des premières réinjections de la souche S_8 après passage chez un animal non préparé, en fonction du temps passé chez celui-ci.

Tableau 33

Souche S_8 non traitée - Animaux préparés aux H.E.P.		
Nombre de T.V.	Nombre d'animaux infestés	I.M.I.
3 $\cdot 10^5$	0 / 20	0
5 $\cdot 10^5$	0 / 15	0
1 $\cdot 10^6$	0 / 12	0
3,5 $\cdot 10^6$	0 / 5	0

Tableau 34

Première réinjection de la souche S_8 après passage chez l'animal en fonction du temps passé chez celui-ci.			
Nombre de jours chez la Souris.	Nombre de T.V.	Nombre d'an. inf.	I.M.I.
5	$5 \cdot 10^5$	$\frac{2^+}{2} / 10$	0,10
	$1 \cdot 10^6$	$\frac{3^+}{3} / 10$	0,15
8	$5 \cdot 10^5$	0 / 10	0
	$1 \cdot 10^6$	$\frac{1^+}{1} / 10$	0,05
14	$5 \cdot 10^5$	$\frac{3^+}{3} / 10$	0,15
	$1 \cdot 10^6$	$\frac{2^+}{1} / 10$	0,15

D - Enfin, le tableau 35, p. 188, présente, avec les dates respectives pour chaque lot, les résultats obtenus pour la première fois par transmission, sans discontinuité, de flagellés de la souche S_8 trouvés mobiles dans les lésions.

La première réinfestation se traduit par un I.M.I. de 0,15, ce qui est modeste eu égard à la dose infestante utilisée (10^6) ; la deuxième donne également des résultats encourageants.

En ce qui concerne la troisième réinfestation, les résultats sont moins bons que prévus car l'I.M.I. reste à 0,20, donc le pouvoir pathogène supplémentaire n'a pas augmenté ; il n'y a toujours qu'une seule lésion, d'ailleurs discrète, qui renferme des trophozoïtes mobiles, ce qui permet de poursuivre les réinfestations.

La quatrième réinfestation semble prometteuse pour l'avenir, puisque 2 souris ont été trouvées avec des lésions contenant des trophozoïtes mobiles ; parmi ces derniers, nous avons remarqué quelques flagellés présentant la même forme en "champignon" que ceux cultivés en présence d'agar.

E - Les caractéristiques du lot ayant reçu 10^6 flagellés traités par l'agar sont :

$\frac{2^+}{2} / 10$ $0,10$

Tableau 35

Première transmission sans discontinuité de trophozoïtes mobiles de la souche S ₈ . Souris neuves.				
Dates	Souche	Nombre de T.V.	Nombre an. inf.	I.M.I.
28/1/70 11/2/70	S ₈	7,5.10 ⁶	3 ⁺ / 10	1,3
1 rep. 13/2/70 5/3/70	↓ 1 ^{ère} réin- festation	10 ⁶	$\frac{2^+}{1}$ / 10	0,15
2 rep. 12/3/70 1/4/70	↓ 2 ^{ème} réin- festation	9.10 ⁵	$\frac{4^+}{3}$ / 15	0,20
2 rep. 6/4/70 27/4/70	↓ 3 ^{ème} réin- festation	10 ⁶	$\frac{7^+}{6}$ / 20	0,20
4 rep. 9/5/70 29/5/70	↓ 4 ^{ème} réin- festation	10 ⁶	$\frac{4^+}{2}$ / 10	0,40
	↓			

III. Discussion

Le P.P. I. de la souche S_8 pour $7,5.10^6$ flagellés se traduit par un I.M.I. de 1,3 ; comme pour 5.10^6 , l'I.M.I. est encore égal à zéro, le P.P.I.M. se situe entre ces deux chiffres.

A - Le problème posé par cette souche peut être abordé de plusieurs façons à partir du moment que l'on tient compte de son P.P.I.

1. Selon le processus décrit dans les tableaux 32 et 35, p.184,188, nous pouvons partir d'un P.P.I. quelconque, en l'occurrence $7,5.10^6$, reprendre les trophozoïtes mobiles ayant subi un passage chez l'animal et les injecter à nouveau, après culture, pour profiter du P.P.S. acquis.

D'après le tableau 34, p. 186, il semble que le temps de passage chez l'animal ne soit pas, dans ce cas, un facteur décisif d'augmentation du pouvoir pathogène.

Cette acquisition de P.P.S. permet, soit de diminuer les doses infestantes, soit d'augmenter l'I.M.I. ; nous avons joué sur ces deux facteurs, la dose infestante a été fixée à 10^6 flagellés et sera conservée tant que l'I.M.I. ne sera pas au moins égal à 1 et que des trophozoïtes mobiles ne seront pas trouvés dans toutes les lésions.

2. Nous pouvons traiter les flagellés par l'agar dont nous avons étudié l'influence et l'efficacité au cours du chapitre précédent. Nous constatons que la dose infestante de 10^6 flagellés s'est révélée légèrement insuffisante pour atteindre d'emblée un pouvoir pathogène exploitable. Nous recommencerons en utilisant une D.I. légèrement supérieure.

La souche sera considérée comme très rajeunie lorsque 250.000 flagellés donneront un I.M.I. supérieur à zéro ; à notre avis, par l'une ou l'autre méthode, c'est maintenant l'affaire de quelques mois.

B - A propos du tableau 33, p.186, il nous semble regrettable que la dernière série ne comporte que 5 animaux car il ne devrait pas être impossible d'obtenir, dans ces conditions, des résultats positifs.

En effet, si nous comparons ces résultats avec ceux fournis par la souche S_{12} (voir tableau 30, p.173), on constate que, pour cette dernière, la différence des I.M.I. est de l'ordre de 3 entre P.P.I.M./Souris neuve et P.P.I.M./Souris traitée (H.E.P.). Si donc, avec $7,5.10^6$ flagellés de la souche S_8 , on obtient une infestation déjà sensible, il doit être possible d'obtenir un résultat positif avec $3,5.10^6$ flagellés injectés à des souris préparées aux H.E.P.

C - Le comportement particulier de la souche S_8 appelle un certain nombre d'autres remarques d'ordre général :

1. La souche S_8 , en ses états actuels, présente trois niveaux différents :

a - Celui correspondant à son P.P.I.M. qui est développé par une population de flagellés comprise entre 5.10^6 et $7,5.10^6$.

b - Celui correspondant à un P.P.S. résultant d'une évolution du P.P.I. au cours de plusieurs passages chez l'animal neuf.

c - Celui correspondant à un P.P.S., différent du précédent, et développé par la souche S_8 cultivée en présence d'agar

Pour la souche S_0 , le développement de ces P.P.S. est lent et progressif, d'autant que nous sommes partis d'un P.P.I. quasi-nul.

2. Cela permet d'affirmer que le P.P.S. est une notion relative puisque l'expérimentateur peut, par exemple, décider que telle souche, qui vient d'être traitée ou qui sort de l'animal, est, à partir de cet instant, une souche de référence et la supposer capable, par une manipulation de conception nouvelle, d'acquérir un nouveau P.P.S.

3. L'expérimentateur peut, s'il veut effectuer de multiples expériences au niveau du parasite ou de l'hôte,

- garder, d'une part, un certain nombre de facteurs constants ou peu variables :

- Souche du parasite, d'origine et d'âge connus,
- Milieu de culture,
- Âge de la souche depuis le dernier repiquage,
- Animal de race pure,
- Âge de l'animal,
- Conditions générales de vie des animaux,
- Temps d'évolution du parasite chez l'hôte.

- d'autre part, combiner d'autres facteurs :

- Souche de parasite à P.P.I.,
- Souche à P.P.S. à confirmer, pour éprouver tel nouveau procédé,
- Animal neuf,
- Animal traité : peut servir à éprouver tel nouveau traitement concernant l'hôte, bien sûr, mais aussi le parasite.

La combinaison de ces facteurs, deux à deux, intervient dans la relation existant entre l'I.M.I. et la D.I.

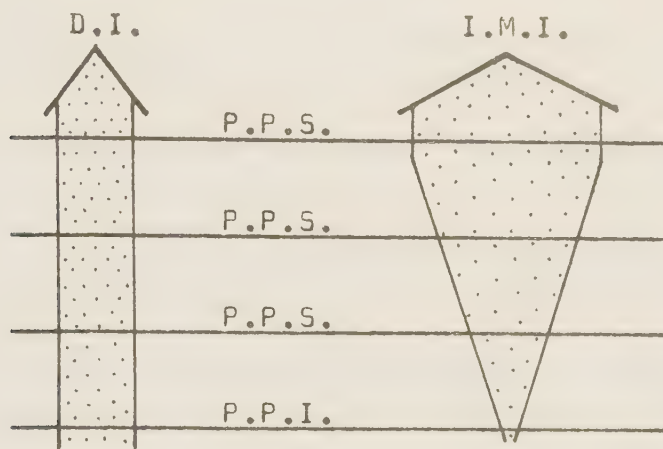
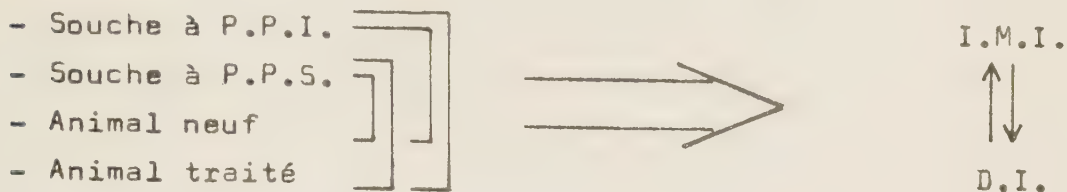


Fig. 5

- pour une même D.I., il ne semble pas possible d'augmenter indéfiniment l'I.M.I. et les meilleurs résultats ont été obtenus avec :

D.I. = 250.000 flagellées

I.M.I. = 6,2

avec le couple souche à P.P.S/Souris traitée. (Figure 5).

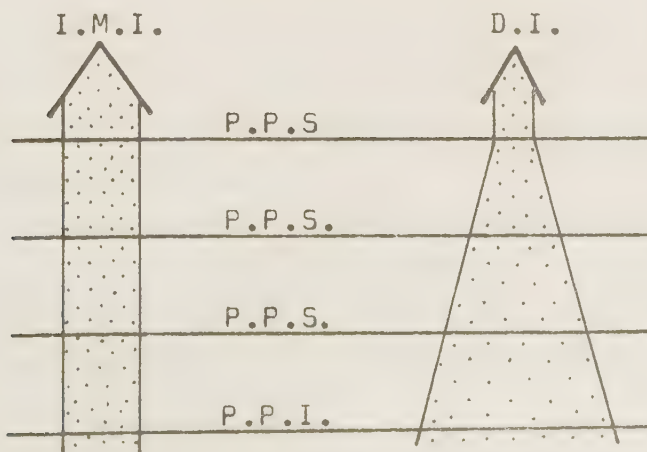


Fig. 6

- pour un même I.M.I. ou pour obtenir un I.M.I. positif, il ne semble pas possible de réduire indéfiniment la D.I., c'est ainsi que, pour une souche S_{12} pathogène, si

$$\begin{aligned} \text{D.I.} &= 20.000 \text{ flagellés} \\ \text{I.M.I.} &= 0. \text{ (Figure 6).} \end{aligned}$$

4. Essayons maintenant de discuter ce qui fait la différence entre la souche S_8 et les autres.

- Si l'on injecte 250.000 flagellés de la souche S_8 à la Souris, il ne se passe rien.

- Si l'on injecte 250.000 flagellés d'une souche S_{12} pathogène, on obtient des lésions.

Puisque les souris sont de race pure, de même âge, qu'elles vivent dans les mêmes conditions et que le temps d'incubation est le même, la différence porte sur Trichomonas lui-même.

Nous avons vu, lors de notre étude histochimique, que les flagellés injectés subissent l'attaque des macrophages ; ce fait a également été montré in vitro (72).

Nous avons également constaté que le traitement par l'agar augmentait le pouvoir pathogène ; or,

- l'action de l'agar semble se faire sentir au niveau de la membrane, comme nous avons essayé de le montrer chapitre VII ;

- le pouvoir pathogène du flagellé peut être considéré comme la résultante entre :

- la possibilité de multiplication du parasite, donc le développement des lésions chez l'hôte,

- les processus de défense de l'hôte qui tendent à neutraliser le parasite.

Ainsi, le développement de l'endoparasitisme peut être considéré comme une course entre ces deux processus opposés.

Le comportement différent des flagellés de la souche S_8 et de la souche S_{12} vis à vis de l'attaque des macrophages serait dû, selon nous, à un état différent de la membrane cellulaire qui, dans le cas de S_{12} pathogène, défierait la phagocytose et l'attaque par les enzymes macrophagiques auxquelles, en revanche, les flagellés de la souche S_8 ne pourraient résister.

Ne peut-on supposer que la souche S_8 , du fait de sa longue conservation in vitro et du contact permanent avec la pénicilline, puisse avoir contracté une "maladie de membrane", qui permettrait sa destruction chez la Souris alors que la souche S_{12} pathogène, à membrane plus résistante, serait capable de proliférer dans les mêmes conditions.

Le pouvoir pathogène aurait donc pour fondement un "état particulier de la membrane" que le contact avec l'agar serait capable de modifier dans un sens qui éviterait la destruction du parasite.

Nous demandons dès maintenant à la microscopie électronique des images qui pourraient venir étayer ou contredire notre manière de voir.

Pour un traitement plus symptomatique de la souche, nous pensons essayer une protection des flagellés de la souche S_8 en les enrobant de dextrane, afin de les protéger, si possible, de l'attaque macrophagique.

A partir de tous ces faits, on peut envisager une organisation dynamique de la membrane cellulaire dont les modifications provoquées sont appelées à jouer un rôle prépondérant dans l'étude biologique et pharmacologique de la cellule.

CHAPITRE IX

Application à l'étude pharmacologique des trichomonacides

L'étude de l'activité trichomonacide in vivo utilise actuellement deux types de techniques :

- la création d'un abcès sous-cutané obtenu par injection de 0,50 ml d'une culture de Trichomonas vaginalis en milieu de Kupferberg [LYNCH, HOLLEY, MARGISON(64)] . Après sept jours, les animaux sont sacrifiés et l'on examine macroscopiquement et microscopiquement la zone d'inoculation. Les sujets témoins présentent des abcès où pullulent les flagellés. En revanche, chez les animaux traités par une dose suffisante d'un produit trichomonacide, le tissu sous-cutané dorsal demeure normal et ne renferme aucun parasite décelable microscopiquement.

- la seconde technique, proposée par CAVIER et MOSSION (15,16), est fondée sur la possibilité d'infester, de façon durable, le vagin de la Ratte castrée et maintenue en oestrus permanent par injection d'oestrogènes.

On apprécie l'activité de la substance essayée par l'examen du produit de lavage vaginal, effectué à intervalles réguliers après la cure, qui révèle la présence ou l'absence de flagellés.

Nous avons pensé que les méthodes et les résultats que nous venons d'exposer et qui concernent l'endoparasitisme de Trichomonas vaginalis, pouvaient trouver une application dans l'étude pharmacologique des substances trichomonacides. Ils apportent la possibilité de suivre l'effet préventif ou curatif sur une affection plus ou moins sévère, provoquée par une souche de Trichomonas vaginalis. Les résultats, sous forme d'expressions chiffrées, permettent d'établir des comparaisons entre des animaux témoins non traités, des animaux traités par un produit connu de référence et des animaux traités par le produit à essayer.

C'est dans cet esprit, qu'à titre d'illustration pharmacologique, nous avons étudié deux substances dont l'activité trichomonacide est universellement reconnue et utilisée :

- la nitrimidazine.
- le métronidazole (Flagyl *).

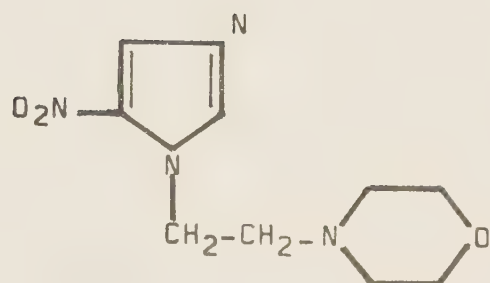
I. Matériel et méthodes

- Souris Swiss Webster de 4-5 semaines et pesant de 16 à 18 grammes ;

- Injection de 4.10^6 flagellés de la souche S_{12} normale, qui sont repris extemporanément au sein de soluté isotonique de glucose additionné de 0,10 p. 100 d'agar.

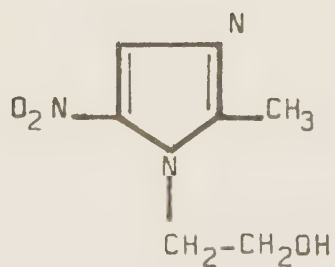
A - Première série d'essais

- Lot de 10 souris témoins.
- Lot de 10 souris qui reçoivent, 48 heures après l'infestation, 50 mg par kg, pendant 5 jours de nitrimidazine par voie buccale.



Nitrimidazine.

(N-β-éthylmorpholino)-1 nitro-5 imidazole.



Métronidazole (Flagyl *).

(hydroxy-2' éthyl)-1 méthyl-2 nitro-5 imidazole.

B - Deuxième série d'essais

- Lot de 18 souris témoins.
- Lots de 20 et 19 souris qui reçoivent respectivement, quelques heures après l'infestation, 100 mg par kg, pendant 5 jours, de nitrimidazine et de métronidazole par voie buccale.

II. Résultats

A - Première série d'essais

1. Souris témoins

8 mortes et $1^+/10$ 15,4

2. Souris traitées à la nitrimidazine

$\frac{10^+}{6}/10$ 3,75

B - Deuxième série d'essais

1. Souris témoins.

12 mortes et $\frac{6^+}{6}/18$

11

3 cultures
positives / 5

2. Souris traitées à la nitrimidazine.

$\frac{17^+}{17}/20$

1,15

1 culture
positive / 5

3. Souris traitées au métronidazole.

$\frac{19^+}{19}/19$

1,10

4 cultures
positives / 5

III. Discussion

A - Lors de la première série d'essais, les souris traitées avec la nitrimidazine restent toutes vivantes. Cependant, 4 souris sur 10 sont retrouvées porteuses de lésions contenant des trophozoïtes mobiles.

L'I.M.I. reste assez important, cela pour deux raisons :

- la dose de 50 mg par kg pendant 5 jours est sans doute un peu faible ;
- de plus, son administration 48 heures après l'infestation est, peut-être, un peu tardive.

B - Lors de la deuxième série d'essais,

- toutes les souris traitées restent en vie,
- toutes sont porteuses de lésions,
- aucun trophozoïte mobile n'est trouvé dans les lésions,
- la persistance des formes de résistance est plus importante avec le métronidazole puisque 4 cultures, sur les 5 effectuées, s'avèrent positives.

Nous devons cependant noter que 12 souris témoins seulement sur 18 meurent. La différence de mortalité des animaux témoins, entre les deux séries d'essais, s'explique par le fait que le jour où fut réalisée la deuxième série, 80 souris furent infestées par nous en une seule séance. Dans ces conditions, la longueur des opérations a entraîné un séjour prolongé des flagellés au sein du sérum glucosé avec, au cours du temps, diminution de leur mobilité et atténuation de leur virulence.

Ce fait peut expliquer aussi la légère différence observée entre les résultats fournis par les deux produits, ou peut masquer, peut-être, une différence d'activité plus accentuée.

Il semble donc qu'en la matière, il soit déconseillé, à un seul opérateur, d'entreprendre des séries comportant un nombre trop important d'animaux afin de limiter, au maximum, le temps qui sépare le flagellé de sa sortie du tube de culture de son injection à l'animal.

En ce qui concerne les deux I.M.I. de 1,15 et 1,10, compte tenu :

- de la D.I. utilisée,
- de l'étalement du traitement au long d'une période de 5 jours,

la formation de lésions est inévitable et le fait de découvrir à l'autopsie des lésions sans flagellé mobile doit faire considérer ces I.M.I. comme les témoins du pouvoir pathogène des flagellés avant que l'action trichomonacide ne se soit complètement développée.

C - Pour pouvoir estimer quantitativement l'activité trichomonacide, on peut opérer aux deux extrêmes de l'échelle des I.M.I.;

- soit en utilisant un nombre convenable de flagellés pour obtenir chez les souris témoins, un I.M.I. de 2 ou 3 et un I.M.I. à peu près nul avec un produit de référence actif. Nous observerions ainsi la destruction des flagellés sans formation de lésions;

- soit, comme nous avons tenté de le faire au cours de ces essais, en utilisant un nombre convenable de flagellés afin de déterminer une mortalité totale chez les souris témoins avec un I.M.I. de 15 ou 16. Chez les souris traitées, on observe alors un pourcentage variable de survie et, à l'autopsie, on notera l'importance de l'I.M.I. témoin de l'activité du produit.

Quoi qu'il en soit, quelle que soit la méthode utilisée, il est important de pouvoir comparer l'activité du produit soumis à l'essai par rapport à des souris témoins non traitées, d'une part, et à des souris traitées par un produit connu de référence, d'autre part.

D - Le pharmacologue peut alors disposer de toute une série de renseignements pour pouvoir évaluer, avec plus de précision, l'action d'une nouvelle molécule.

1. Par comparaison des résultats avec ceux fournis par les souris témoins :

a. Pourcentages de lésions si l'on travaille dans la zone inférieure des I.M.I. ;

b. Pourcentages de morts si l'on est dans la zone supérieure des I.M.I. ainsi que pourcentages de souris vivantes parasitées ;

c. Pourcentages de lésions à formes de résistance par rapport aux lésions à trophozoïtes mobiles ;

d. Pourcentages des cultures positives après la mise en culture de lésions sans trophozoïtes mobiles. (Rappelons à ce propos, l'utilisation de l'Amphotéricine B lors de la mise en culture, la conservation et la surveillance des tubes pendant 15 jours avant de les déclarer négatifs et de les éliminer).

e. Valeur des I.M.I. obtenus

2. Par comparaison des résultats avec ceux observés chez des souris traitées avec un produit de référence.

On utilise les mêmes critères de comparaison que les précédents pour évaluer si la nouvelle molécule est moins efficace ou plus efficace que le produit de référence.

3. Il est aussi possible, en mettant en oeuvre le traitement plus ou moins tôt par rapport à l'infestation, de pouvoir apprécier l'effet curatif ou préventif de ces substances.

On constate donc l'importance, relative, des matériels et méthodes utilisées, pourvu que ceux-ci soient exactement les mêmes pour les différents lots, puisque tous les renseignements fournis le sont par comparaison.

- CONCLUSIONS GENERALES -

Dans ce travail que nous avons consacré à divers aspects de l'endoparasitisme de Trichomonas vaginalis chez la Souris, nous avons eu l'occasion de décrire nombre de phénomènes liés au pouvoir pathogène qu'exerçait, dans nos conditions d'expériences, le flagellé sur son hôte.

Il est important d'insister sur le fait que nos observations ont été réalisées sur un couple hôte-parasite très différent de celui observé dans la nature et ne mettant plus en jeu les rapports habituels de spécificité dont dépend l'adaptation de celui-ci à celui-là.

Quoiqu'il en soit, l'implantation du flagellé chez l'animal fait intervenir, en-dehors du pouvoir pathogène du parasite, les facteurs propres aux localisations anatomiques où celui-ci évolue et la dose infestante utilisée.

Les manifestations pathologiques observées sont la résultante des interférences entre :

- les possibilités de multiplication du parasite dont dépend, au moins en partie, le développement de lésions chez l'hôte ;
- les réactions de défense développées par l'hôte qui tendent à neutraliser le parasite.

Nous avons obtenu des modifications du pouvoir pathogène de Trichomonas vaginalis :

- d'une part, en l'implantant chez un hôte inhabituel, donc au niveau de tissus étrangers ;
- d'autre part, en le plaçant, in vitro, au contact de cellules de diverses origines et, même, de substances chimiques définies.

Dans le premier cas, nos résultats pourraient être interprétés dans le cadre classique de la spécificité parasitaire, selon lequel un parasite exerce, chez un hôte, des désordres d'autant plus notables qu'il y est moins adapté ; dans le second cas, en revanche, nous sommes en présence de phénomènes intéressant le parasite lui-même, qui subit de la part des matériels vivants ou inertes, avec lesquels il est en contact, des modifications qui ne sont pas étrangères à l'accroissement du pouvoir pathogène qui se manifeste ultérieurement chez l'animal. Chez celui-ci, le pouvoir pathogène se révèle et peut être apprécié, ce qui est encore impossible de la part d'un flagellé dans son tube de culture.

A notre avis, le pouvoir pathogène, plus ou moins affirmé, du parasite, chez la Souris, semble lié à un état particulier de la membrane cellulaire, capable de se modifier suivant diverses circonstances, telles que le temps de séjour en culture ou les conditions expérimentales imposées, in vitro ou in vivo.

L'existence de formes de résistance, immobiles dans les lésions, mais capables de reviviscence et de multiplication quand elles sont mises en culture, nous paraît, elle aussi, faire intervenir des modifications de la surface cellulaire et, peut-

être, d'autres secteurs, comme semble le montrer la disparition des flagelles.

Si, maintenant, nous comparons l'endoparasitisme expérimental, au parasitisme spontané que l'on observe chez la femme, nous pouvons constater que ce dernier dépend de la résistance générale que l'individu oppose à son développement ainsi que de la composition du milieu vaginal où évolue le flagellé.

Pour ne parler que du second facteur, certains constituants mucopolysaccharidiques ont une structure qui évoque celle de l'agar dont nous avons rapporté l'influence sur le pouvoir pathogène des flagellés.

Ainsi pourraient s'expliquer les différences de pouvoir pathogène observables entre les souches prélevées chez la femme et qui seraient liées à la nature particulière des sécrétions d'un vagin à l'autre.

Le pouvoir pathogène s'exprime chez l'animal par le pouvoir pathogène intrinsèque. Les différences de P.P.I. constatées entre les souches dépendent de l'"histoire" de chacune d'elles. Les lésions alors observées chez l'animal jouent le rôle de révélateur d'un pouvoir qui ne s'exprimait que peu ou prou dans le vagin de la femme.

Pourquoi cette différence ? En dehors de tout problème de spécificité parasitaire et d'adaptation du parasitisme à son milieu, il faut remarquer que les conditions d'existence du flagellé changent d'un cas à l'autre.

Le vagin est une cavité ouverte dans laquelle se déroule en continu la desquamation des cellules épithéliales de la muqueuse et où s'écoulent les sécrétions naturelles, le flux menstruel et les liquides de lavage. Tout ceci doit concourir à limiter la surpopulation des protozoaires.

En empêchant ces écoulements, on pourrait peut-être observer l'apparition de lésions beaucoup plus importantes, comparables à celles qui se développent dans la cavité abdominale ou sous la peau, emplacements qui ne permettent aucun drainage.

Un point nous a frappé et concerne le comportement, *in vitro*, de Trichomonas vaginalis en présence d'agar.

Bien que séparé de son hôte, nous le voyons alors capable, en présence d'une situation toute nouvelle, de développer un certain nombre de réactions qui ne sont pas le fait du hasard puisqu'elles se déroulent toujours selon le même processus et de façon ordonnée.

D'ordinaire, le pouvoir pathogène d'un parasite s'entend comme l'expression des relations existant dans le couple hôte - parasite..

Nous avons voulu dissocier ce couple en faisant intervenir, *in vitro* ou *in vivo*, des facteurs tiers et étudier les modifications qui en découlaient dans les systèmes artificiels ainsi créés.

Il sera sans doute intéressant, dans l'avenir, de diversifier ce genre d'association n'existant pas spontanément dans la nature et faire intervenir d'autres formes vivantes, des cellules, des bactéries ou des virus. Cela ouvrira peut-être au biologiste des voies nouvelles d'exploration et de connaissance.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ADLER S.
The presence of amylase in the Karyoplasm of Trichomonas vaginalis.
Acta. Med. Orient. 1953, 12, 204-205.
- 2 - ASAMI K.
Physiological studies on Trichomonas vaginalis.
Kaio J. Med. Jap. 1956, 5, 169-190.
- 3 - ASAMI K., NAKAMURA H.
Am. J. trop. Med., 4, 254.
Shorb : The physiology of Trichomonas
in Biochemistry and Physiology of Protozoa.
Ed. Hutner, 1964, Academic Press.
- 4 - BAERNSTEIN H.D.
Aldolase in Trichomonas vaginalis.
Exp. Parasit., 1954, 4, 323-333.
- 5 - BAERNSTEIN H.D.
Lactic Deshydrogenase in Trichomonas vaginalis.
J. Parasitol., 1959, 45, 491-498.
- 6 - BAERNSTEIN H.D.
Malic Deshydrogenase in Trichomonas vaginalis.
J. Prot., 1960, 47, 279-284.
- 7 - BARR F.S., BRENT B.J.
The activity of various drugs against Trichomonas vaginalis in vivo.
Antibiot. Chemother, 1960, 10, 637-639.
- 8 - BARNETT R.J., SELIGMAN A.
J. Nat. Cancer. Inst. 1954, 14, 769.
in Lison op. cit.
- 9 - BARNETT R.J., SELIGMAN A.
J. Nat. Cancer. Inst. 1952, 13, 215.
in Pearse op. cit.
- 10 - BERTHELOT M.
Rapport de Chimie Appliquée.
PARIS, 1859, p. 254.

- 11 - BOCCI A., DURANDO C.
Les formes de résistances du Trichomonas de Donné.
Les infestations à Trichomonas. 283-288.
Premier Symposium Européen (Reims, Mai 1957).
- 12 - BOGOVSKY P.A., TERAS Y.K.
Pathologico-anatomical changes in white mice in intraperitoneal infection by culture of Trichomonas vaginalis.
Med. parasit. and Parasitic. Dis., 1958, 27, 194-199.
- 13 - BOS A.
Ueber Trichomoniasis bei Tauben. IV Mitteilung :
Pathogenität von Trichomonas columbae für Mäuse.
- 14 - CAVIER R., GEORGES P., SAVEL J.
Contribution à l'étude cytologique de Trichomonas vaginalis Donné 1836.
Ann. Parasitol. Hum. Comp. 1965, 40, 407-420.
- 15 - CAVIER R., MOSSION X.
Essais d'infestation expérimentale de la Ratte par Trichomonas vaginalis Donné 1837.
C. R. Acad. Sc. 1956, 242, 2412.
- 16 - CAVIER R., MOSSION X.
Nouveaux essais d'infestation de la Ratte par Trichomonas vaginalis Donné 1837.
C. R. Acad. Sc. 1956, 243, 1807.
- 17 - CHOU J.T.Y.
Quart. J. Micro. Sc., 1957, 98, 47-59 et 431.
in Lison op. cit.
- 18 - COMBESCOT C.H., PESTRE M., DOMENECH A., VERRAIN A.
Rôle du terrain endocrinien au cours de l'infestation expérimentale de la Ratte albinos par Trichomonas vaginalis Donné 1837.
Soc. Gynécol. obst. Alger - Séance du 4 Avril 1957.
- 19 - DANIELLI
Symp. Soc. Exp. Biol., 1947, 1, 101 (variante Burstone 1955).
in Pearse op. cit.
- 20 - DEPRAITERE H., DETRAVERSE P.M., COQUELET M.L.
Mesure des protéines du sérum et du plasma à partir de la densité.
Annales de Biologie Clinique n° 10-12 Octobre-Décembre 1957.

- 21 - DONNE M.A.
Infusoires. Animalcules observés dans les matières purulentes et le produit des sécrétions des organes génitaux de l'Homme et de la Femme.
C. R. Acad. Sc. 1836, 385-386.
- 22 - ETINGER H., HALEVY S.
Lipid biochemistry of Trichomonas vaginalis.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 1964, 58, 409-413.
- 23 - FROST J.K., HONIGBERG B.M.
Comparative pathogenicity of Trichomonas vaginalis and Trichomonas gallinae to mice.
II - Histopathologie of subcutaneous lesions.
J. Parasit. 48, 1962, 898-918.
- 24 - GABE M.
Techniques Histologiques.
Ed. Masson, Paris, 1968.
- 25 - GEORGES P.
Etude expérimentale sur le comportement biologique de différentes espèces du genre Trichomonas.
Thèse d'Etat en Pharmacie, 1964.
- 26 - GINEL W.
O zmianach w Btonie Sluzowej Pochwy zwierzat ciezarnych pa wptywem Trichomonas vaginalis Donné.
Wiadom, osci Parazytologiczne, Polska, 1962, 8, 217-221.
- 27 - GLENNER G.G.
J. of Histochem and cytochem 1957, 5, 297.
in Pearse op. cit.
- 28 - GRABAR P., WILLIAMS C.A.
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines.
Biochem. Biophys. Acta. 1953, 10, 195.
- 29 - GRASSE P.P.
Traité de zoologie - Anatomie, Systématique, Biologie.
Tome I, 1^{er} Fascicule. Phylogénie. Protozoaires.
Généralités. Flagellés.
Masson et Cie, Ed. 1952.
- 30 - HAMADA Y.
Biological Study of Trichomonas vaginalis (3rd report).
Inoculation test in experimental animal.
Han Dai.. Igakushi (Osaka Univ. Med. J.) 5, 511-521.

- 31 - HAWES R.S.
On the structure division and systematic position
of Trichomonas vaginalis Donné with a note on its
methods of feeding.
Jl. Micros. Sci. 1947, 88, 79-98.
- 32 - HUESTLAND W.A., HADLEY M.F., MERCER S.E., SANDCOCK B.K.
Proc. SO. Exp. Biol. N.Y. 1947, 65, 324.
in Altam P.L. Blood and other body fluids.
Ed. Dorothy S. Dittmer, 1961.
- 33 - HOFFMAN W.S.
A rapid photoelectric method for the determination
of glucose in blood and urine.
J. Biol. Chem. U.S.A., 1937, 120, 51-55.
- 34 - HOFFMANN B., GORCZYNSKI M., KARBOWSKI J.
Trichomonas vaginalis found after death un cancerous
foci of the lungi and liver and the spleen in a patient
with Trichomonadosis.
Wiad. Parazyt. Polska, 1966, 12, 261-265.
- 35 - HOFFMANN B., MALYSZKO E.
An attempt to discover the cause of Trichomonas vaginalis
multiplication by multiple division.
Wiadom. Parazytol. Polska, 1966, 12, 312-315.
- 36 - HOLLANDER D.H., FROST J.K.
Demonstration of a minimum oxidation reduction potential
requirement for Trichomonas vaginalis.
Journal of Bacteriology, 1965, 89, 1610-1612.
- 37 - HONIGBERG B.M.
Comparative pathogenicity of Trichomonas vaginalis and
Trichomonas gallinae to mice -
I - Gross pathologie, quantitative evaluation of virulence
and some factors effective pathogenicity.
J. Parasit., 1961, 47, 545-571.
- 38 - HONIGBERG B.M., EWALT A.C.
Preliminary observation on pathogenicity of Trichomonas
vaginalis of cell culture.
Progress in Protozool., 1963, 568-569.
- 39 - HONIGBERG B.M., KING V.M.
Structure of Trichomonas vaginalis Donné
J. Parasit., 1964, 50, 345-364.

- 40 - HONIGBERG B.M., MANDEL M. (erratum: MANDEL M., HONIGBERG B.M.).
Isolation and Characterization of Deoxyribonucleic Acid of Two
Species of Trichomonas Donne.
J. Protozool. 1964, 11, 114 - 116. voir ref. n° 67.
- 41 - HONIGBERG B.M., MARTHA C., LINVINGSTON M.A., FROST J.K.
Pathogenicity of fresh isolates of Trichomonas vaginalis.
"The Mouse" essay" versus clinical and pathologic findings.
Acta cytologica, 1966, 10, 353 - 361.
- 42 - HONIGBERG B.M., READ C.P.
Virulence Transformation of a Trichomonad Protozoan.
Science U.S.A., 1960, 131, 352 - 353.
- 43 - HOTCHKISS R.D.
Arch. Bioch. 1948, 16, 131.
in Lison op. cit.
- 44 - HUTCHINSON J.H., LABBY D.H.
New method for microdetermination of blood ammonia by use
of cation exchange resins.
J. Lab. Clin. Med., 1962; 60, 170 - 178.
- 45 - INOKI S., HAMADA Y.
Experimental transmission of Trichomonas vaginalis
(pure culture) into mice.
J. Infect. Dis. 1953, 92, 1 - 3.
- 46 - INOKI S., NAKANISHI K., NAKABAYASHI T.
Electron microscopic observations of Trichomonas vaginalis
employing the thin section technique.
Gynecologia 1960, 49, (sup.), 48 - 54.
- 47 - IWAI S.
Experimental inoculation of pure culture of Trichomonas
vaginalis into small laboratory animals.
Jap. J. Parasit. 1957, 6, 136 - 144.
- 48 - IYORI S.
Nisshin Igaku 1959, 46, 436 - 442, 686 - 691, 759 - 765.
in Jirovec, Petru - op. cit.
- 49 - JAAKMEES H.
Dissertatie A.N. Eston SSR (Tallin) 1965.
in Jirovec, Petru op. cit.
- 50 - JAAKMEES H., TERAS J.
Intradermal reaction with specific antigens in cases of
genito - urinary Trichomonadosis.
Wiadom. Parazytol. Pologne, 1966, 12, 385 - 391.

- 51 - JEFFRIES L., HARRIS M.
Observation on the maintenance of Trichomonas vaginalis and Trichomonas foetus. The effects of cortisone and agar on en trancement of severity of subcutaneous lesions in mice. Parasitology 1967, 57, 326 - 334.
- 52 - JIROVEC O., PETRU M.
Trichomonas vaginalis and Trichomonadosis.
Advances in Parasitology, 1968, 6, 117 - 188.
- 53 - KOJIMA
in Jirovec, Petru op. cit.
- 54 - KULDA J.
Notes on the applicability of different strains of laboratory mice for the evaluation of the virulence of Trichomonads by the methods of Honigberg.
Acta Par. Pol., 1965, 13, 93 - 102.
- 55 - KUNITAKE G., STITT C., SALTMAN P .
Terminal respiration in Trichomonas vaginalis.
J. Protozool., 1962, 9, 371 - 373.
- 56 - KUPFERBERG A.B.
Metabolic studies and chemotherapy of Trichomonas vaginalis.
Gynecol. 1960, 149, sup., 114 - 121.
- 57 - KURNATOWSKA A.
Acta Protozool. Polon. 1966, 4, 185 - 200.
in Jirovec Petru op. cit.
- 58 - LAAN I.N.
On the effect of passages in vitro and in vivo on the pathogenicity, agglutinative ability and fermentative activity of Trichomonas vaginalis.
Proc. III Pan polish Symposium on Trichomonosis, Bralyskov.
- 59 - LANGERON M.
Précis de microscopie.
Collection de Précis Médicaux.
Masson et Cie, Editeurs, 1949.
- 60 - LAPIERRE J.
Introduction à l'étude des formes de résistance de Trichomonas vaginalis Donné.
Les infestations à Trichomonas 271 - 276.
Premier Symposium Européen (Reims, Mai 1957).

- 61 - LINDBLOM G.P.
Carbohydrate metabolism of Trichomonads. Growth, respiration and enzyme activity in four species. Protozool. 1961, 8, 139 - 150.
- 62 - LINDGREN R.D., IVEY M.H.
The effect of cultivation and freezing on the virulence of Trichomonas vaginalis for mice. J. Parasit. 1964, 50, 226 - 228.
- 63 - LISON L.
Histochimie et cytochimie animales. 3ème édition, volume I et II. Ed. Gauthier - Villars, Paris, 1960.
- 64 - LYNCH J.E., HOLLEY E.C., MARGISON J.E.
Studies on the use of the mouse as a laboratory animals for the evaluation of antitrichomonal agents. The action of 2I agents. Ant. Chemoth., 1955, 5, 508 - 514.
- 65 - MAC MANUS J.F.A.
Nature 1946, 158, 202.
in Lison op. cit.
- 66 - MAGARA M., AMIND E., YOKOUTI E.
One method for the pure culture of Trichomonas vaginalis. Amer. J. Trop. Med. and Hyg., 1953, 2, 267 - 270.
- 67 - MANDEL M., HONIGBERG B.M.
Isolation and characterization of Deoxyribonucleic acid of two species of Trichomonas Donné. J. Protozool., 1964, II, 114 - 116.
- 68 - MARSH W.H., FINGERHUT B., KIRSCH E.
Amer. J. Clin. Patho., 1957, 28, 681.
- 69 - MICHAELS R.M.
Chemotherapy of Trichomoniasis. Advances in Chemotherapy, 1968, 3.
- 70 - MICHAELS R.M., STRUBE R.E.
Antitrichomonal agents. 5 nitrothiazoles. 5 nitropyridines and 5 nitropyrimidines. J. Pharm. Pharmacol., 1961, 13, 601 - 610.

- 71 - MICHALZIK K.
Contribution à la morphologie et la biologie du
Trichomonas vaginalis.
Les infestations à Trichomonas. 277 - 280.
Symposium de Reims - Mai 1957).
- 72 - MICHEL R., WESTPHAL A., GARCIA W., KORN⁻⁻⁻MÜLLER K.
Die peritonealzell reaktion mit Trichomonas vaginalis
sensibilisierter Mäuse.
Z. Tropen. med. Parasitol. Dtsch., 1968, 19, 355 - 370.
- 73 - MIESSNER H., HANSEN K.
Trichomoniasis der Tauben. Beut. tierärztl.
Wochenschr. Daut. Tieraztl. Rundschau - 4436, 44, 323 - 330.
in Honigberg 1961, op. cit.
- 74 - MILLER G.E., RICE J.D.
Determination of the concentration of ammonia nitrogen
in plasma by means of a simple sion exchange method.
Amer. J. Clin. Path. 1963, 39, 97 - 103.
- 75 - MIRSKY - POLLISTER, RIS- 1946.
in Lison , Op. cit.
- 76 - MOORE D.H.
J. Biol. Chem. 1945, 161, 21.
in Altaman P.L., op. cit.
- 77 - MORGAN B.B.
Inoculation with Trichomonas foetus (Protozoa) in white
rats and mice.
Proc. Helminth Soc. Washington. 1942, 9, 68 - 71.
et
Inoculations of Trichomonas foetus (Protozoa) in guinea pigs.
Proc. Helminth Soc. Washington. 1943, 10, 26 - 29.
- 78 - NIELSEN M.H., LUDVIK J., NIELSEN R.
On the ultrastructure of Trichomonas vaginalis Donné.
Journal de Microscopie, Fr, 1966, 5, 229 - 249.
- 79 - NIGESEN U.
Eesti N S U. Tead Akad Toim. (Tallin), 1961, 23 - 33.
in Jirovec, Petru, op. cit.
- 80 - PAPANOCOLAOU G.N ., WOLINSKA W.H.
Vaginal cytology in Trichomonas infestation.
Internat. Record Med., U.S.A., 1955, 168, 551 - 556.

- 81 - PARONIKJAN G.M.
Izv. Akad Nauk, Armyan. SSR, 1958, II, 5157.
in Jirovec, Petru, op. cit.
- 82 - PEARSE A.G.E.
Histochemistry - 2 ème édition
Ed. Churchill, London, 1960.
- 83 - READ C.P., ROTHMAN A.H.
Preliminary notes on the metabolism of Trichomonas vaginalis.
Amer. J. Hyg. 1955, 61, 249 - 260.
- 84 - REARDON L.V., ASHBURN L.L., JACOBS L.
Differences in strains of Trichomonas vaginalis as revealed
by intraperitoneal injections into mice.
The Journal of Parasitology, 1961, 47, 527 - 532.
- 85 - REICHARD H., REICHARD P.
Determination of ornithine carbamyl transferase in Serum.
J. Lab. and Clin. Med., 1958, 52, 709.
- 86 - SAMUELS R.
Studies on variability of Trichomonas vaginalis.
Abst. 1st Intern. Conf. Protozool. Prague, 1961, 187.
- 87 - SAVEL J.
La culture de Trichomonas vaginalis Donné 1837.
Les infestations à Trichomonas 237 - 243
Premier symposium Européen (Reims Mai 1957).
- 88 - SCHEIDEGGER J.J.
Une microméthode de l'immunoélectrophorèse.
Internat. Arch. Allergy. 1955, 7, 103.
- 89 - SCHMIDT-HOENSDORF.
Comparaison sur le cycle évolutif de quelques Trichomonades.
Le problème des kystes.
Les infestations à Trichomonas 289 - 291.
Premier symposium Européen (Reims, Mai 1957).
- 90 - SCHNITZER R.J., KELLY D.R., LEIWANTZ B.
Experimental studies on Trichomoniasis.
I - The pathogenicity of Trichomonas species for mice.
J. Parasitol. 1950, 36, 343 - 349.
- 91 - SCHOENHERR K.E.
Z. Immunitätsforsch. u. Exp. Therapie, 133, 83 - 94.
in Teras, 1963, op. cit.

- 92 - SHARMA N. N., BOURNE G.H.
Cytochemical studies in Trichomonas vaginalis.
Acta histochem. Bd, 1966, 23, 9 - 22.
- 93 - SHARMA N.N., BOURNE G.H.
Distribution of adenosine - triphosphatase in
Trichomonas vaginalis.
Acta histo. chem. Bd, 1967, 26, 210 - 221.
- 94 - SHARMA N.N., BOURNE G.H.
Histochemical studies on the distribution of
phosphatases in Trichomonas vaginalis.
Acta Histochem. Bd, 1967, 28, 335 - 344.
- 95 - SHARMA N.N., BOURNE G.H.
Studies on the histochemical distribution
of oxydative enzyme in Trichomonas vaginalis.
J. Histochem. Cytochem, 1963, II, 628 - 634.
- 96 - SKEGGS L.T.
An automatic method for colorimetric analysis.
Amer. J. Clin. Pathol. U.S.A., 1957, 28, 311 - 322.
- 97 - SMITH B.F., STEWART B.T.
Fine structure of Trichomonas vaginalis.
Exper. Parasitol, U.S.A., 1966, 19, 52 - 63.
- 98 - SOSKA S., KAZANOWSKA W., KUCZYNSKA K.
On injury of the epithelium of the vagina caused by
Trichomonas vaginalis in experimental animals.
Wiadom. Parazytol. Polska, 1962, 8, 209 - 215.
- 99 - STABLER R.M., HONIGBERG B.M., KING V.M.
Effect of certain laboratory procedures on virulence
of the Jones' Barn strain of Trichomonas gallinae.
for pigeons.
J. Parasitol., 1964, 50, 35 - 41.
- 100 - TERAS J.
Eksperimentalne issledovanie patogennosti Trichomonas
vaginalis.
Dis. Tard. Gos. Univ. Tartu 1954.
in Jirovec , Petru, op. cit.
- 101 - TERAS J.
On the effect of sanazine upon Trichomonas vaginalis.
in vitro and in vivo.
Antibiotiki, URSS, 1959, 4, 66 - 69.

- IO2 - TERAS J.
On the questions of the types of Trichomonas vaginalis.
Progress in Protozoology. Ludwick et al. eds.
C. Rech. Acad. Scien. 1963, 572 - 576.
- IO3 - TERAS J., NIGESSEN U.
Izvesti A.N. Eston. SSR, Tallin, 1961, 65 - 67.
in Jirovec-Petrù, op. cit.
- IO4 - TERAS J., ROIGAS E.
Characteristic of the patho - morphological reaction in
cases of experimental infection with Trichomonas vaginalis.
Wiadom. Parasitol. Pologne, 1966, 12, 161 - 172.
- IO5 - TRUSSEL R.E.
Trichomonas vaginalis and Trichomoniasis.
Charles C. THOMAS, Publischer, Springfield - Illinois.
First edition, 1947.
- IO6 - TRUSSEL M.C., NUTT S.H.
Animal inoculation with pure cultures of
Trichomonas vaginalis and Trichomonas foetus.
J. inf. Dis. 1941, 69, 18 - 28.
- IO7 - UHLENHUTH P. SCHOENHERR K.E.
Untersuchungen über die Übertragung. Smöglichkeiten
verschiedener Trichomonde narten auf Kleine versvchstiere.
Z. Immunitäts - forschung exper. Therapie Dtsch.
1955, 112, 48 - 56.
- IO8 - VAISMAN A., HAMELIN A.
Hydroxymycine nouvel antibiotique actif sur
Trichomonas vaginalis.
C. R. Acad. Sc., 1958, 247, 163 - 165.
- IO9 - VAN LOON E.J., LIKENS M.R., SEGER A.J.
Photometric method for blood amylase by use
of starch - iodine color.
Am. J. Pathol., 1952, 22, 1134 - 1136.
- II0 - VERSHINSKY B.V.
Experiment on the infection of Mesocricetus
auratus with Trichomonas vaginalis Donné 1836.
Zoologistsheskij Journal, URSS, 1957, 36, 1774 - 1776.
- III - VERSHINSKY B.V.
The pathogenicity of Trichomonas vaginalis Donné 1836.
A Kushin, URSS, 1958, 34, 76 - 80.

- II2 - WAGNER O.
Trichomonas as causative agent of disease in
Medecine in its chemical aspects, 1938, 3, 75 - 85.
- II3 - WAGNER O., HEES E.
Der Kulturelle Nachweis von Trichomonas vaginalis
und andersen Trichomonasarten.
Zbl. Bakt. I orig., 1935, 135, 310 - 317.
- II4 - WEISS, TSOU, SELIGMAN.
J. Histochem. and cytochem, 1954, 2, 29.
in Gabe, op. cit.
- II5 - WELD J.T., KEAN B.H.
Experimental ocular trichomoniasis.
Pathologic observation.
J. Pathol., 1956, 32, II35 - II45.
- II6 - WELLERSON R., KUPFERBERG A.B.
On glycolysis in Trichomonas vaginalis.
J. Protozool., 1962, 9, 418 - 424.
- II7 - WIRTSCHAFTER S.K.
Evidence for the existence of the enzyme
Hexokinase and Aldolase in the protozoan
parasite Trichomonas vaginalis.
J. Parasit., 1954, 40, 360 - 362.
- II8 - WIRTSCHAFTER S., JAHN T.L.
The metabolism of Trichomonas vaginalis.
the glycolytic Pathway.
J. Protozool, 1956, 3, 83 - 85.
- II9 - WITTFOGEL H.
Vergleichende studien über pathogene Trichomonaden.
Inaug. Diss. Hanover
in Honigberg, 1961, op. cit.
- I20 - YASUMA A., ICHIKAWA T.
Labor. Clin. Med. 1953, 41, 296.
in Pearse op. cit.

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Pages
AVANT-PROPOS	1
INTRODUCTION : I - Position systématique	4
II - Morphologie	8
III - Biologie	13
CHAPITRE I - Obtention d'infestations expérimentales par différentes espèces du genre <u>Trichomonas</u> . Travaux antérieurs.	20
I - Infestations expérimentales par voie vaginale	21
II - Infestations expérimentales par voie sous-cutanée	24
III - Infestations expérimentales par voie intra-musculaire	26
IV - Infestations expérimentales de la chambre antérieure de l'oeil et du corps vitré ...	27
V - Infestations expérimentales par voie intrapéritonéale	27
CHAPITRE II - <u>Trichomonas vaginalis</u> , endoparasite de la Souris. Etude préliminaire des conditions d'installation.	36
I - Matériel et méthodes	38
A - Préparation des souris	38
B - Souches de <u>Trichomonas vaginalis</u> utilisées	40
Définition Flagellés normaux, souches normales	40
C - Milieu de culture et procédés d'utilisation	40

	<u>Pages</u>
D - Réinoculation, à des animaux neufs, des flagellés prélevés sur des animaux infestés	42
E - Culture des souches S ₁₂ , S ₁₃ , S ₁₄ , en présence de broyats hépatiques ou pancréatiques	42
II - Résultats	43
A - Utilisation des hématies de Poulet	43
B - Utilisation d'autres agents de préparation	47
C - Réinoculation des flagellés après passage chez l'animal	49
D - Traitement des souches S ₁₂ , S ₁₃ , S ₁₄ par des broyats de cellules hépatiques ou pancréatiques	51
III - Discussion	53
IV - Conclusion	56
CHAPITRE III - Etude cytologique et histologique des lésions provoquées chez la Souris par l'endoparasitisme de <u>Trichomonas vaginalis</u> .	58
I - Matériel et méthodes	58
A - Animaux	58
B - Souches	59
C - Réactifs	59
D - Protocole opératoire de la coloration trichromique type Masson	60
II - Résultats	61
A - Examen macroscopique	61
B - Examen microscopique	63
III - Discussion	69
IV - Conclusion	71
CHAPITRE IV - Etude histochimique des lésions parasitées .	74
I - Matériel et méthodes	74
A - Etude des glucides	74

	<u>Pages</u>
B - Etude des protides	79
C - Etude des lipides	87
D - Infestation des souris	89
II - Résultats	89
A - Concernant les substances glucidiques	89
B - Concernant les protides	97
C - Concernant les lipides	101
III - Discussion	101
IV - Conclusion	103
CHAPITRE V - Modifications humorales au cours de l'endo- parasitisme de <u>Trichomonas vaginalis</u> chez la Souris	107
I - Matériel et méthodes	108
A - Animaux	108
B - Souches	108
C - Méthodes de dosage	108
II - Résultats	116
A - Ornithine carbamyl transférase sérique	116
B - Amylase sérique	117
C - Glucose plasmatique	117
D - Urée sanguine	118
E - pH sanguin	118
F - Protides	120
III - Discussion	123
A - Ornithine carbamyl transférase	123
B - Amylasémie	123
C - Glycémie	124
D - pH sanguin	125
E - Protides	125
IV - Conclusion	126

	<u>Pages</u>
CHAPITRE VI - Essais d'implantation chez la Souris de la souche S_8 réfractaire à l'endoparasitisme.	128
I - Matériel et méthodes	130
A - Traitement de la souche S_8	130
B - Traitement des souris	132
II - Résultats	133
III - Interprétation mathématique et discussion	136
A - Souris non préparées	139
B - Souris préparées	141
C - "Formes latentes" cultivées et réinjectées	143
IV - Conclusion	145
CHAPITRE VII - Etude expérimentale et expression du pouvoir pathogène des souches S_{12} et S_{14} .	147
I - Matériel et méthodes	148
A - Souris	148
B - Cages	148
C - Traitement des souches S_{12} et S_{14} par addition d'un homogénéisat de <u>Trichomonas vaginalis</u> de la souche S_{12} pathogène	148
D - Addition extemporanée de l'homogénéisat de la souche S_{12} pathogène à une souche S_{12} normale vivante ...	150
E - Addition extemporanée d'une suspension de la souche S_{12} pathogène tuée par chauffage	150
F - Immunodépresseurs	150
G - Agar	152
H - Détermination de l'indice moyen d'infestation	153
II - Résultats	155

	<u>Pages</u>
III - Discussion	167
Pouvoir pathogène intrinsèque	170
Pouvoir pathogène intrinsèque minimum	170
Pouvoir pathogène supplémentaire ..	171
IV - Conclusion	179
CHAPITRE VIII - Nouveaux essais d'acquisition d'un pouvoir pathogène supplémentaire par la souche S ₈	182
I - Matériel et méthodes	183
II - Résultats	184
III - Discussion	189
CHAPITRE IX - Application à l'étude pharmacologique des trichomonacides	196
I - Matériel et méthodes	197
A - Première série d'essais	197
B - Deuxième série d'essais	199
II - Résultats	199
A - Première série d'essais	199
B - Deuxième série d'essais	200
III - Discussion	201
CONCLUSIONS GENERALES	205
BIBLIOGRAPHIE	209
TABLE DES MATIERES	221

Vu et permis d'imprimer
Paris, le 25 JUIN 1970

Le Doyen

~~Malangeau~~

P. MALANGEAU.

